

Université de Montréal

L'effet de la déficience en acides gras essentiels
et des acides gras peroxydés sur le peroxysome

par

Guy Lepage

Département de Pédiatrie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Docteur (Ph.D.)
en Sciences Biomédicales

Juillet 1998

© Guy Lepage, 1998



W
4
U58
1998
V.091

Institut de l'Université

L'Institut de l'Université est autorisé à reproduire
et à distribuer gratuitement les copies de ce document

Guy Lapointe

Département de Philosophie

Université de Montréal

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Philosophie (M. Phil.)
en Philosophie (Théologie)

Publié par

Éditions de l'Université de Montréal



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

L'effet de la déficience en acides gras essentiels
et des acides gras peroxydés sur le peroxyosome

présentée par:

Guy Lepage

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

| | |
|------------------------|------------------------|
| Emile Levy | président du jury |
| Claude C. Roy | directeur de recherche |
| Philippe Chessex | membre du jury |
| Louise Brissette | examineur externe |
| Edgard Delvin | représentant du doyen |

Thèse acceptée le 30 juillet 1998

Sommaire

La déficience en acides gras essentiels (AGE) peut affecter l'intégrité des membranes, de leurs récepteurs et de leurs canaux ioniques, la régulation d'une variété d'activités enzymatiques et le maintien de l'immunité cellulaire et humorale.

Nous avons démontré que la moitié des enfants atteints de la Fibrose Kystique du Pancréas (FKP) étaient déficients en AGE. De plus, ces patients avaient un taux plasmatique de vitamine E plus faible. Ils sont donc, plus sujets à la peroxydation des AGE. Les jeunes malades avec atteinte hépato-biliaire étaient particulièrement plus vulnérables. Lors d'une première étude pilote, l'analyse par chromatographie gazeuse a démontré que les patients FKP et déficients en AGE avaient des acides gras circulants à très longue chaîne augmentés et des plasmalogènes diminués. Une seconde étude pilote a confirmé ces résultats dans les phospholipides cardiaques et hépatiques de rats déficients en AGE

Suite à ces 2 études pilote, nous avons émis l'hypothèse suivante: la déficience en AGE et/ou leur peroxydation peut entraîner une dysfonction peroxysomiale. En effet, le peroxysome cellulaire est responsable du catabolisme des AG à chaîne très longue et de l'anabolisme des plasmalogènes.

Dans notre première étude, nous avons émis l'hypothèse que la peroxydation lipidique pouvait être en partie responsable de la déficience en acides gras essentiels chez les patients FKP. Nous avons mesuré un taux élevé de malondialdéhyde, signe de peroxydation lipidique, malgré des niveaux normaux de vitamine E plasmatique, suite à une supplémentation quotidienne. Par contre, les concentrations mesurées de β -carotène étaient très faibles. Suite à une supplémentation de 2 mois en β -carotène, le malondialdéhyde s'est normalisé. Toutefois, le statut des acides gras essentiels est resté inchangé.

Comme la déficience en acides gras essentiels est plus fréquente et plus sévère chez les malades avec atteinte hépato-biliaire, notre seconde étude a voulu vérifier si l'amélioration de la fonction hépatique chez des patients FKP entraînait

des effets bénéfiques sur leur statut en acides gras essentiels. La supplémentation en acide ursodéoxycholique, a entraîné la diminution de la cytolyse et de l'inflammation hépatique. Une amélioration du statut des acides gras essentiels, en particulier une normalisation de l'acide arachidonique ont accompagné ces manifestations.

Notre troisième étude, d'aspect plus fondamental, avait pour objectif d'étudier la relation potentielle entre la déficience en AGE, le stress oxydatif et la fonction peroxysomiale. Le modèle animal utilisé nous a permis de démontrer qu'en soi la déficience en AGE n'entraîne pas de dysfonction peroxysomiale. Toutefois, lorsque celle-ci est produite par la peroxydation lipidique on note des modifications dans la structure du peroxysome, ainsi qu'une augmentation de l'activité de la β -oxydation des acides gras et de la catalase, enzymes peroxysomiales clés contre le stress oxydatif cellulaire.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--------------------------------------------------------|-----|
| Sommaire | iii |
| Liste des tableaux | ix |
| Liste des figures | xi |
| Liste des abréviations | xii |
| Dédicace | xiv |
| Remerciements | xv |
| Avant-propos | xvi |
| | |
| PREMIÈRE PARTIE: Introduction | 1 |
| Chapitre 1: Revue de la littérature | |
| 1.1 Les lipides | 2 |
| 1.1.1 Nomenclature | 2 |
| 1.1.2 Acides gras essentiels | 5 |
| 1.2 La peroxydation lipidique | 9 |
| 1.2.1 Détermination de la peroxydation lipidique | 11 |
| 1.2.2 Les antioxydants | 14 |
| 1.3 Vitamines liposolubles | 16 |
| 1.3.1 Le β -carotène | 16 |
| 1.3.1.1 Absorption intestinale | 17 |
| 1.3.1.2 Phase entérocytaire | 18 |
| 1.3.1.3 Transport lymphatique | 18 |
| 1.3.1.4 Réserve hépatique | 19 |

| | | |
|---------|--------------------------------------------|----|
| 1.3.2 | Le rétinol | 19 |
| 1.3.2.1 | Rôles | 19 |
| 1.3.2.2 | Absorption intestinale | 20 |
| 1.3.2.3 | Incorporation aux chylomicrons | 20 |
| 1.3.2.4 | Storage dans la cellule de Ito | 21 |
| 1.3.2.5 | Sortie des cellules de Ito | 21 |
| 1.3.2.6 | Transport extra-hépatique | 22 |
| 1.3.2.7 | Hypervitaminose A | 22 |
| 1.3.3 | La vitamine E | 23 |
| 1.3.3.1 | Absorption intestinale | 23 |
| 1.3.3.2 | Transport extra-hépatique | 24 |
| 1.4 | Les acides biliaires | 24 |
| 1.4.1 | L'acide ursodéoxycholique | 26 |
| 1.5 | La Fibrose Kystique du Pancréas | 27 |
| 1.5.1 | Génétique | 28 |
| 1.5.2 | Présentation clinique | 28 |
| 1.5.3 | Diagnostic | 28 |
| 1.5.4 | Manifestations pulmonaires | 29 |
| 1.5.5 | Manifestations gastro-intestinales | 30 |
| 1.5.6 | Complications hépato-biliaires | 31 |
| 1.5.7 | Malnutrition et besoins énergétiques | 32 |
| 1.6 | Le peroxysome | 33 |
| 1.6.1 | β -oxydation des acides gras | 34 |

| | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------|
| 1.6.2 | Biosynthèse des plasmalogènes | 36 |
| 1.6.3 | L'acide phytanique | 38 |
| 1.6.4 | Le cholestérol | 39 |
| 1.6.5 | Les acides biliaires | 40 |
| 1.6.6 | Fonction antioxydante | 42 |
| DEUXIÈME PARTIE: Contribution originale | | 43 |
| Études pilote | | 44 |
| Hypothèses de travail et buts du projet de recherche | | 45 |
| Chapitre 2: <i>Supplementation with carotenoids corrects increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis</i> | | |
| 2.1 | Abstract | 48 |
| 2.2 | Introduction | 49 |
| 2.3 | Subjects and Methods | 50 |
| 2.4 | Results | 54 |
| 2.5 | Discussion | 56 |
| 2.6 | References | 60 |
| 2.7 | Figures | 67 |
| 2.8 | Tables | 71 |
| Chapitre 3: <i>Ursodeoxycholic acid improves the hepatic metabolism of essential fatty acids and retinol in children with cystic fibrosis</i> | | |
| 3.1 | Abstract | 77 |
| 3.2 | Introduction | 79 |
| 3.3 | Methods | 81 |

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.4 | Results | 85 |
| 3.5 | Discussion | 87 |
| 3.6 | References | 91 |
| 3.7 | Tables | 98 |
| | | |
| Chapitre 4: | <i>Exogenous lipid peroxidation products alter the structure and function of peroxisomes</i> | |
| 4.1 | Abstract | 105 |
| 4.2 | Introduction | 106 |
| 4.3 | Materials and methods | 107 |
| 4.4 | Results | 112 |
| 4.5 | Discussion | 115 |
| 4.6 | References | 119 |
| 4.7 | Tables | 125 |
| | | |
| TROISIÈME PARTIE: Discussion générale et perspectives d'avenir | | |
| Chapitre 5: | Discussion générale | 135 |
| Chapitre 6: | Perspectives d'avenir | 156 |
| Bibliographie | | 159 |
| Appendices | | 199 |
| Curriculum vitae | | 207 |

Liste des tableaux

| | | |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 2-1 | CF patient characteristics | 71 |
| Tableau 2-2 | Plasma malondialdehyde and fatty acid profiles | 72 |
| Tableau 2-3 | Effects of β -carotene supplementation on plasma β -carotene, RBP, retinol and tocopherol | 73 |
| Tableau 2-4 | Effect of β -carotene supplementation on plasma fatty acid profiles | 74 |
| Tableau 3-1 | Clinical features of cystic fibrosis patients with liver disease at entry into the UDCA trial | 98 |
| Tableau 3-2 | Effects of ursodeoxycholic acid on liver-enzyme profile | 99 |
| Tableau 3-3 | Effects of ursodeoxycholic acid on plasma lipid concentrations | 100 |
| Tableau 3-4 | Effects of ursodeoxycholic acid on plasma fatty acid concentrations | 101 |
| Tableau 3-5 | Effects of ursodeoxycholic acid on plasma RBP, transthyretin, retinol and retinyl ester concentrations | 102 |
| Tableau 4-1 | Composition of rat diets | 125 |
| Tableau 4-2 | Fatty acid composition of semisynthetic diets (μ mol/g) 10 weeks after the beginning | 126 |

| | | |
|--------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 4-3 | Effect of the diets on intake, feces, liver and body weights | 127 |
| Tableau 4-4 | Effect of the diets on plasma and hepatic malondialdehyde | 128 |
| Tableau 4-5 | Effect of the diets on plasma and hepatic concentrations of α - and γ -tocopherol, β -carotene and retinol | 129 |
| Tableau 4-6 | The effect of the diets on plasma lipids | 130 |
| Tableau 4-7 | Plasma fatty acid composition (mol%) from rats fed various diets | 131 |
| Tableau 4-8 | Hepatic fatty acid composition (mol%) from rats fed various diets | 132 |
| Tableau 4-9 | Effect of the diets on hepatic peroxisomal density, protein... content, the palmitoyl-CoA oxidation and the catalase capacity in the liver | 133 |

Liste des figures

| | | |
|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1-1.1 | Désaturation et élongation des acides gras dans le foie | 4 |
| Figure 2-1 | All- <i>rac</i> - α -tocopherol and β -carotene concentrations in 17 control subjects and 24 patients with cystic fibrosis | 68 |
| Figure 2-2 | Effect of 4.42 mg (1.22 μ mol) β -carotene three times per day during a 2-mo open trial in 12 children with cystic fibrosis | 69 |
| Figure 2-3 | Relation between plasma β -carotene and plasma malondialdehyde concentrations before and after β -carotene supplementation | 70 |

Liste des abréviations

| | |
|----------|----------------------------------------------------------------|
| AA : | acide arachidonique |
| AB: | acide biliaire |
| AG : | acide gras |
| AGE : | acide gras essentiel |
| AUDC: | acide ursodéoxycholique |
| B-C : | β -carotène |
| CF: | Fibrose Kystique du Pancréas |
| CFTR: | régulateur transmembranaire de la Fibrose Kystique du Pancréas |
| CH: | cholestérol |
| CM : | chylomicron |
| CRBP: | protéine cellulaire liant le rétinol |
| FKP : | Fibrose Kystique du Pancréas |
| GLC: | chromatographie gazeuse |
| HDL : | lipoprotéine de haute densité |
| HPLC: | chromatographie liquide haute pression |
| LDL : | lipoprotéine de faible densité |
| MDA: | malondialdéhyde |
| MDA-TBA: | malondialdéhyde-acide thiobarbiturique |
| PER : | peroxysome |
| PL: | phospholipide |
| RBP : | protéine liant le rétinol |
| SOD: | superoxyde dismutase |

| | |
|---------------|-------------------------------------|
| TLC: | chromatographie sur couche mince |
| UDCA: | acide ursodéoxycholique |
| VLDL : | lipoprotéine de très faible densité |
| γ GT : | γ -glutamyltranspeptidase |

Aux enfants atteints de Fibrose Kystique du Pancréas

L'amour, le travail et la connaissance sont les sources de notre vie.

Ils devraient aussi la gouverner.

Wilhelm Reich, 1897-1957.

Ici et maintenant.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à Danielle, mon épouse, pour son amour et sa tendresse, pour sa patience et son support. Merci à Philippe et Julien, mes fils, pour leur compréhension.

J'aimerais remercier particulièrement le docteur Claude Roy, mon directeur de recherche et mon professeur au cours des 26 dernières années. Je le remercie pour avoir cru en moi et pour m'avoir transmis la passion de la recherche. J'ai grandement bénéficié des connaissances transmises. Son enthousiasme, sa rigueur, son dynamisme intarissable et son sens du devoir resteront pour moi un exemple. Il a été pour moi et restera un phare par vent de tourmente et mers agitées. Merci encore Professeur!

Je suis particulièrement redevable à Nancy Ronco et Josée Champagne, techniciennes du laboratoire, pour leur aide et leur soutien quotidien tant scientifique qu'humain. Mes remerciements vont à Danielle St-Cyr, secrétaire, pour son professionnalisme et sa grande disponibilité.

Je voudrais également témoigner ma reconnaissance au docteur Louis Dumont, professeur de pharmacologie, pour son amitié inconditionnelle et son ironie, bien souvent outil de dernier recours.

Enfin, je tiens à remercier Pascale Petit pour m'avoir écouté et Michel Tremblay pour m'avoir appris l'importance d'agir Ici et Maintenant.

AVANT-PROPOS

Les lipides sont une source d'énergie chez l'homme au même titre que les protéines et les hydrates de carbone. Cette source d'énergie est essentielle à la croissance de l'enfant, non seulement en vertu de son apport calorique, mais aussi par son rôle de constituant membranaire et son effet sur l'inflammation, l'immunité et le métabolisme général. Les lipides responsables sont certains acides gras polyinsaturés, dit essentiels, parce qu'ils ne peuvent pas être synthétisés par l'organisme. En vertu de leur constitution chimique, leurs nombreuses doubles liaisons peuvent facilement être oxydées par l'oxygène. De source de vie, l'oxygène devient aussi responsable de la mort, car la peroxydation lipidique entraîne la nécrose cellulaire et joue un rôle clé pour déclencher le processus d'apoptose. Heureusement, la nature a prévu des mécanismes de défense: les antioxydants endogènes et exogènes. Les enfants atteints de Fibrose Kystique du Pancréas (FKP) absorbent mal les lipides et les vitamines antioxydantes liposolubles; la moitié d'entre eux souffrent de déficience en acides gras essentiels (AGE). Plusieurs études ont essayé, sans grand succès, de corriger cette déficience. Nous tenterons au cours de cette thèse de vérifier si une supplémentation de 2 mois en β -carotène peut normaliser leur statut en AGE en les protégeant contre la peroxydation. Avec l'âge, un grand nombre de patients FKP développent des manifestations hépatiques de la maladie. Nous examinerons l'effet d'une supplémentation en acide ursodéoxycholique sur leur statut en AGE et en vitamines antioxydantes. Enfin, dans un modèle animal, nous tenterons d'avoir une approche plus réductionniste. Contre toute attaque, la nature réagit. La survie en dépend! Par quels mécanismes la cellule s'acclimate-t-elle à ces deux attaques que sont la déficience en AGE et leur peroxydation? Y a-t-il interaction ou indépendance entre ces deux problèmes? Le peroxysome est un organelle cellulaire, responsable du métabolisme de certains lipides et le site de défense enzymatique contre les attaques oxydatives intracellulaires. Nous verrons dans un modèle animal si le peroxysome peut jouer un rôle contre la peroxydation lipidique et s'il est affecté par la déficience en AGE.

Nous tenterons donc au cours de cette thèse de doctorat de comprendre un peu mieux certaines implications et conséquences de la déficience en AGE et de la peroxydation des lipides. Pour ce faire, après une introduction qui aidera à comprendre l'importance des différents intervenants, les buts et hypothèses de cette thèse seront présentés. Suivront la présentation des résultats de trois études de recherche. Les deux premières études sont d'aspect clinique et portent sur des enfants atteints de FKP. Dans chacune de ces études, après avoir cerné un problème spécifique et présenté une hypothèse de travail, nous tentons d'y apporter une solution et nous discutons des résultats obtenus. La troisième étude est une recherche d'aspect plus fondamental. Elle tente de comprendre certains mécanismes de défense cellulaire contre les deux types d'agression que sont pour l'organisme la déficience en AGE et la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans un modèle animal. La discussion générale des résultats de ces trois études terminera cette thèse de doctorat.

PREMIÈRE PARTIE

INTRODUCTION

Chapitre 1

Revue de la littérature

1.1 Les lipides

Les lipides jouent plusieurs rôles sur la fonction cellulaire. Ils servent de carburants énergétiques, d'acides gras essentiels et de véhicules pour les vitamines liposolubles. Les triglycérides constituent la presque totalité des graisses de l'alimentation animale. Une molécule de triglycéride comporte trois chaînes d'acides gras (AG) estérifiées à une molécule de glycérol. Les trois AG peuvent être saturés ou insaturés. La molécule d'AG ne possède pas de charge alors que la molécule de phospholipide est composée de deux chaînes d'acides gras et d'un résidu alcool lié au glycérol 3-phosphate. Le phospholipide est de nature ionique.

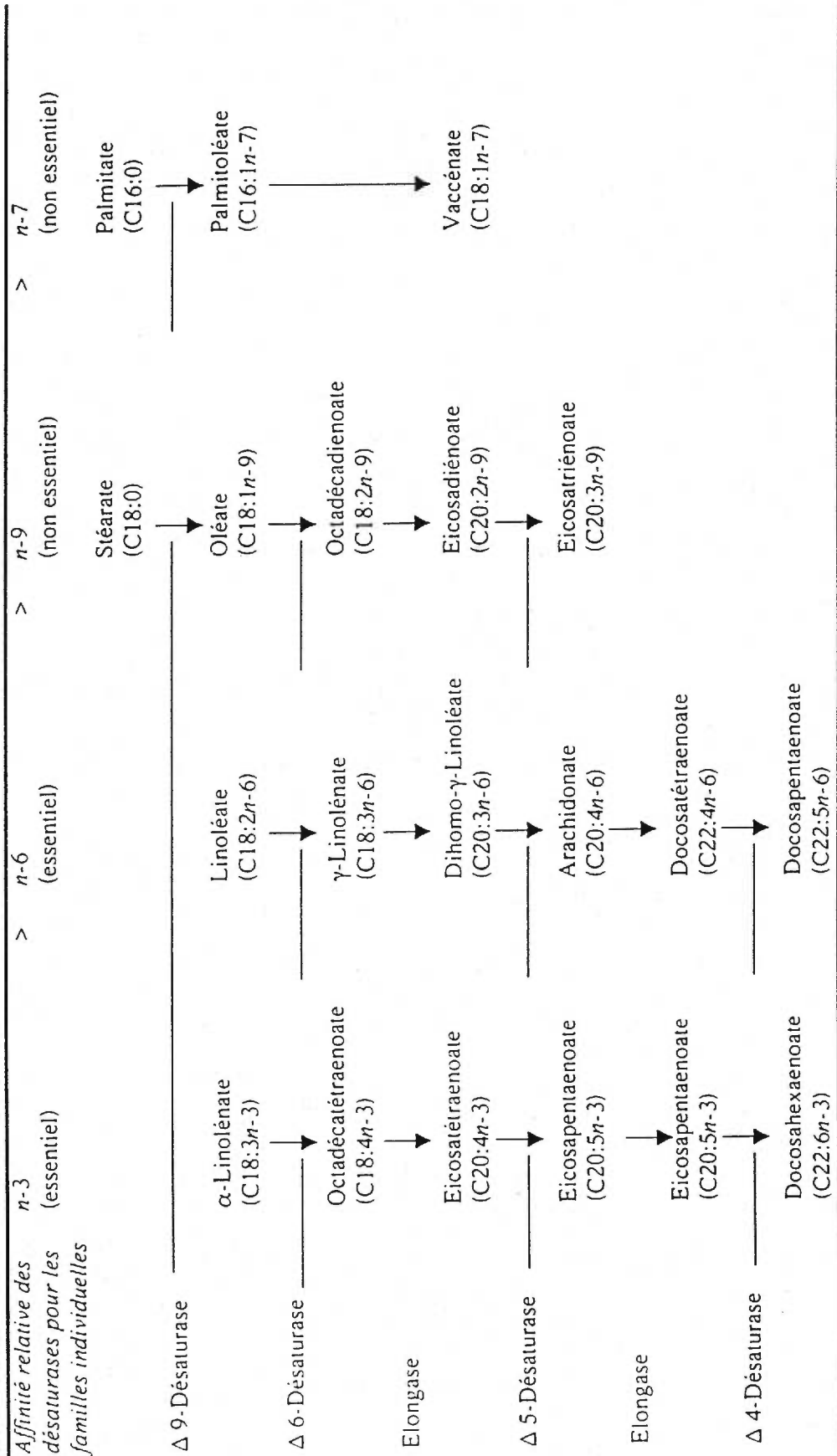
1.1.1 Nomenclature

Dans la nomenclature IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) le carbone carboxyle de l'acide gras est le C-1 et les autres carbones sont numérotés dans l'ordre. La nomenclature courante utilise les lettres grecques pour identifier les atomes de carbone de la chaîne hydrocarbonée. La nouvelle nomenclature utilise la lettre n plutôt que ω pour identifier le carbone le plus éloigné du carbone carboxyle, quelle que soit la longueur de la chaîne. Le chiffre qui suit ce n indique la position du premier carbone avec une liaison double, en partant du carbone terminal. Ainsi, l'acide linoléique, ou C18:3 n -3, est un acide gras de 18 carbones comportant 3 insaturations dont la première est sur le troisième carbone à partir du carbone n terminal.

Les AG insaturés ont été classifiés en quatre familles selon la position de leur première double liaison. Les acides linoléique et linoléique des familles n -3 et n -6 sont appelés AGE parce que l'organisme humain ne peut les synthétiser. Par ailleurs,

les AG des familles $n-9$ et $n-7$ sont considérés non-essentiels car les acides stéarique et palmitique peuvent donner respectivement naissance aux acides oléique et palmitoléique.

FIGURE 1.1.1
 DÉSATURATION ET ÉLONGATION DES ACIDES GRAS DANS LE FOIE



1.1.2 Acides gras essentiels

La **Figure 1.1.1** illustre la cascade des différents AG naissants suite à l'action des désaturases et élongases situées dans les microsomes hépatiques. On remarque que l'affinité de ces désaturases est variable pour les différents AG et qu'elle suit l'ordre décroissant suivant: $n-3 > n-6 > n-9 > n-7$ (1).

Les queues hydrocarbonées des acides gras ont leurs atomes de carbone à l'état de réduction maximale. C'est ainsi que l'oxydation d'un segment de six carbones d'acides gras a un rendement énergétique bien supérieur à l'oxydation du glucose. Près de 9 kcal sont produites lors de l'oxydation d'un gramme d'acide gras, alors qu'un gramme de glycogène n'en fournit que 4 (2).

Une étude sur les effets d'une diète sans lipide a conduit à la découverte de la déficience en AGE, il y a maintenant plus de 60 ans (3). Dans le laboratoire de Burr et plus tard dans celui de Holman (4), il a été démontré que les acides gras polyinsaturés des lipides tissulaires étaient transformés après leur ingestion diététique. On trouva une corrélation entre l'acide linoléique (C18:2 $n-6$) de la diète et l'acide arachidonique (C20:4 $n-6$) tissulaire. Au contraire, l'acide eicosatriénoïque (C20:3 $n-9$), abondant dans les tissus d'animaux déficients en AGE, était supprimé lors de la supplémentation en acide linoléique. Ce dernier est le précurseur de l'acide arachidonique, et le C18:3 $n-3$ donne naissance au C20:5 $n-3$ et au C22:6 $n-3$, tel qu'illustré dans la **Figure 1.1.1**. Le C20:3 $n-9$ augmente lors de la diminution du C20:4 $n-6$ dans des cas de déficience en AGE et provient de l'acide oléique (C18:1 $n-9$).

Lorsque le C18:3 $n-3$ et le C18:2 $n-6$ sont absents de la diète, leurs familles respectives d'AG polyinsaturés ne peuvent plus être formées. Les acides gras saturés C18:0 et C16:0 sont alors désaturés par la Δ^9 -désaturase, et les AG monoinsaturés résultants sont alors convertis en AG polyinsaturés non essentiels des familles $n-9$ et $n-7$ par la même route enzymatique. On pense que cette conversion serait une substitution partielle aux AG $n-6$ et $n-3$ normalement formés (5). C'est la

désaturation microsomiale hépatique qui fait naître le C20:4n-6 du C18:2n-6 (6). Comme l'illustre la **Figure 1.1.1**, ce sont les mêmes désaturases hépatiques qui sont responsables de la désaturation des 4 familles d'acides gras. C'est pourquoi il existe une compétition entre ces substrats (1). Chez les mammifères, il n'y a pas d'interconversion possible entre les différents AG polyinsaturés (5). Lorsque des quantités insuffisantes de C18:3n-3 et de C18:2n-6 sont ingérées, l'activité de la $\Delta 9$ -désaturase est alors majorée et les acides gras C18:1n-9 et C16:1n-7 sont augmentés (7). Par la suite, lorsque la $\Delta 6$ -désaturase ne trouve pas de quantité suffisante de substrat C18:3n-3 et C18:2n-6, elle utilise le C18:1n-9 qui devient du C20:3n-9 après élongation et désaturation. De plus, lorsqu'il se produit une baisse d'AG polyinsaturés, le foie augmente l'activité de la $\Delta 6$ -désaturase afin de combler ce déficit. Ceci a pour effet d'augmenter la production de C20:3n-9 (8).

Après avoir remarqué l'augmentation du C20:3n-9 lors d'une diminution de C20:4n-6, Holman proposa le ratio C20:3n-9/C20:4n-6 comme index du statut nutritionnel des AGE (9). Les besoins en AGE furent établis selon la mesure des AG polyinsaturés tissulaires chez des animaux recevant différents apports diététiques de C18:3n-3 et de C18:2n-6 (10). Le rapport C20:3n-9/C20:4n-6 est encore valide aujourd'hui. Il existe par contre des situations bien particulières où ce ratio semble normal en présence de déficience en AGE. Il a été démontré chez le chat et suggéré dans la FKP que la $\Delta 6$ -désaturase pouvait être déficiente (11). Ainsi, en présence de quantité tout à fait normale de C18:2n-6, ni le C20:4n-6 ni le C20:3n-9 ne peuvent être formés. Le ratio C20:3n-9/C20:4n-6 apparaît alors tout à fait normal, avec un niveau de C18:2n-6 plasmatique adéquat et même souvent augmenté, puisqu'il n'est pas métabolisé. Siguel a proposé le ratio C16:1n-7/C18:2n-6 comme autre mesure du statut des AGE. En effet, lorsque les niveaux d'AG polyinsaturés baissent, la $\Delta 9$ -désaturase est activée et le C16:1n-7 est formé à partir du C16:0 (5). Nous avons nous-mêmes vérifié les changements de ce ratio dans une étude portant sur la déficience en AGE chez des enfants atteints de FKP. Une étude statistique "Stepwise discriminant" nous a permis de conclure que le ratio C16:1n-7/C18:2n-6 représentait

chez ces enfants un meilleur rapport de discrimination que le ratio de Holman pour établir la déficience en AGE (12).

Les lipides sont essentiels à notre survie et nous fournissent bien plus qu'un apport énergétique important. Ils jouent des rôles bien spécifiques sur la structure membranaire, le métabolisme et l'immunité. Les acides gras polyinsaturés sont dits essentiels parce qu'ils doivent provenir de l'alimentation. En effet, alors que les AG saturés et monoinsaturés peuvent être synthétisés par la cellule, les AG polyinsaturés sont intégrés aux phospholipides responsables du maintien de la structure et de la fonction des membranes (13).

A la naissance, le dépôt adipeux compte pour plus de 90% des calories accumulées par le fœtus (14). Un retard de croissance s'accompagne de déficience en AGE. Il existe une corrélation directe entre le poids d'un nourrisson et son contenu plasmatique en acide arachidonique (15). Le cerveau est composé de 60% de lipide et utilise le C20:4n-6 et le C22:6n-3 pour sa croissance, sa fonction et son intégrité (16). C'est non seulement le développement, mais aussi le fonctionnement visuel et neurologique qui peuvent être altérés suite à un déficit en AGE (17,18).

La composition en AG peut affecter les canaux ioniques dont le canal chlore, le transport membranaire, la régulation des activités enzymatiques, la fonction des récepteurs et la disponibilité des précurseurs des médiateurs intra- et intercellulaires (19,20). Les AGE ont un effet important sur la fluidité et la fonction membranaire (21). En altérant les caractéristiques physicochimiques de la matrice lipidique membranaire, ils influencent la conformation, la mobilité et la fonction d'une grande variété de protéines intrinsèques et extrinsèques liées à la membrane. Celles-ci constituent les récepteurs hormonaux, les barrières et les canaux ioniques (22,23).

Les AGE ont aussi un rôle de second messenger. Lorsque les AG C20:3n-6, C20:4n-6 et C20:5n-3 sont relâchés des phospholipides membranaires sous l'action des phospholipases A₂ et C, la cyclooxygénase les transforme en prostaglandines des séries I, II et III ainsi qu'en thromboxanes (24). Ces AG de même que le C22:6n-3 peuvent se transformer en leukotriènes sous l'action de la lipooxygénase (25). Les

eicosanoïdes, et certains dérivés hydroxy et époxy d'AGE sont importants comme second messenger pour la traduction du signal endocrinien. Ils peuvent influencer le métabolisme du glucose, des lipides et des protéines de la cellule (26). La liaison d'un AG à un récepteur active la protéine G et l'adénylate cyclase, ce qui induit la synthèse de l'AMP cyclique. Ils auront aussi pour effet d'augmenter la protéine kinase C (27). En d'autres circonstances, les AG pourront également avoir un effet inhibiteur.

Les AGE peuvent exercer une influence considérable aussi bien sur les réponses immunitaires, que sur les réactions inflammatoires. Un déficit en AGE entraîne une atrophie lymphoïde, une diminution de l'immunité humorale et cellulaire, ainsi qu'une augmentation de la sensibilité aux infections (24). Inversement, la supplémentation en AGE modifie la réponse immunitaire par deux mécanismes; en altérant la structure membranaire et en modifiant la synthèse des eicosanoïdes qui sont à l'origine des changements dans les processus d'immunité cellulaire et humorale (24). Lorsque des rats sont nourris avec un lait déficient en AGE, la structure de leur thymus subit des dommages, ce qui affecte le développement de leur système immunitaire (28). La prolifération des lymphocytes, étape primordiale de la réponse immunitaire cellulaire, dépend d'un approvisionnement suffisant en cholestérol et en AGE (29). La présence d'AG *n*-3 dans les phospholipides membranaires diminue la réactivité des cellules à divers stimuli. La capacité de production de TNF- α par les cellules mononucléaires et la réduction des troubles profonds apportés à l'organisme par les cytokines en sont deux exemples (30). A l'exception du PGI₂, tous les eicosanoïdes formés à partir de l'arachidonate sont de puissants agents pro-inflammatoires (31). Une formation accrue de PGE₂ paraît responsable de la dépression immunitaire observée dans des conditions d'inflammation chronique, d'infections chroniques et de lésions tissulaires (29). Il est proposé qu'une modification des AGE dans la diète affecte la présentation de l'antigène, une fonction immunitaire médiée par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité liées à la membrane (32).

1.2 La peroxydation lipidique

Les AGE sont donc très importants à plusieurs titres. Même si l'apport alimentaire est suffisant, leur disponibilité dépend aussi de leur bonne absorption et de leur protection contre la peroxydation. Ils sont très sensibles à l'attaque radicalaire à cause de la double liaison entre les atomes d'hydrogène et de carbone, qui est un lien très faible (33). Ils doivent être protégés par un système de défense antiradicalaire sophistiqué qui est associé à des vitamines antioxydantes, des micronutriments et des enzymes spécialisés. Les lipoprotéines transportent normalement leurs propres antioxydants qui sont par le fait même liposolubles. La vitamine E est la plus connue (34). Les dommages cellulaires par les radicaux d'oxygène et la peroxydation lipidique jouent un rôle crucial dans la pathogénèse des maladies chroniques et aiguës, tels que le cancer, l'inflammation, l'état de choc, les affections hépatiques, l'arthrite rhumatoïde, le vieillissement et l'athérosclérose (17,35). Les radicaux libres sont aussi impliqués dans trois pathologies liées à la prématurité du nouveau-né: la dysplasie pulmonaire chronique, la rétinopathie et l'hémorragie intraventriculaire. Alors que la première serait dépendante de l'hyperoxie, les 2 autres seraient plutôt reliées aux conséquences de l'hypoxie-reperfusion (36). Tel est aussi le cas pour les dommages hépatiques subis lors d'une transplantation (37). Les membranes biologiques sont à risque et peuvent être altérées parce qu'elles contiennent de grandes quantités d'AG polyinsaturés (38). Le réticulum endoplasmique perd alors de son efficacité à séquestrer le calcium et l'activité de la Ca^{2+} -ATPase microsomiale est diminuée. La perméabilité au Ca^{2+} est alors augmentée (39). Ces activités enzymatiques sont protégées lorsque les membranes sont préalablement traitées avec divers antioxydants (39). Les dommages peroxydatifs du DNA sont habituellement causés par les AG peroxydés et peuvent être prévenus par divers antioxydants liposolubles (40,41).

Le stress oxydatif apparaît dans une cellule quand l'équilibre entre les espèces prooxydantes et antioxydantes est rompu en faveur de l'état prooxydant. La rupture de cet équilibre est due à la promotion d'espèces de l'oxygène activées, ou radicaux libres oxygénés (42). Dans les systèmes vivants, la production de radicaux libres

oxygénés se fait de manière continue. Toutes les molécules biologiques possédant des doubles liaisons sont particulièrement affectées par les radicaux libres, ce qui explique la très grande réactivité des lipides, des protéines et de l'ADN (43). Les AGE, hautement polyinsaturés, sont donc des cibles de choix pour les radicaux libres (44). Ils sont sujets à la peroxydation lipidique à cause de leur lien très faible entre les atomes d'hydrogène et de carbone que l'on retrouve entre les doubles liaisons (33). Ces atomes d'hydrogène sont alors facilement retranchés de la couche orbitale externe, et les radicaux libres qui en résultent sont capables à leur tour de soustraire de nouveaux atomes d'hydrogène des AG polyinsaturés adjacents. L'induction d'une telle réaction en chaîne *in vitro* a réussi à inclure 92 AG polyinsaturés provenant de membranes liposomiales (45). De nombreux métabolites issus de la réaction, tel que le 4-hydroxynonéanal, ont la capacité *per se* de propager le processus de peroxydation lipidique.

Un radical libre est une espèce chimique, molécule ou simple atome, capable d'avoir une existence indépendante, qui contient un ou plusieurs électrons célibataires. Il s'agit d'un électron non apparié sur une orbitale. Cela lui confère une grande réactivité et donc une demi-vie très courte. En effet, ce radical libre aura toujours tendance à remplir son orbitale en captant un électron afin de devenir stable. Il réussira à réduire en oxydant un autre composé. Cette réaction est nommée système redox (46). La réactivité chimique de radicaux libres de l'oxygène est variable selon la molécule considérée, mais ce sont pour la plupart de puissants oxydants. Les principaux radicaux libres qui entrent dans les processus physiopathologiques humains sont les radicaux superoxyde et hydroxyle, mais d'autres dérivés de l'oxygène jouent également un rôle important dans le stress oxydatif, en particulier le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde nitrite (47).

Le radical superoxyde est produit à partir de l'oxygène moléculaire, principalement dans les cellules phagocytaires, tel que les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les éosinophiles. Ils participent ainsi à l'inactivation des virus et des bactéries (48). Cependant, lorsque ces cellules sont stimulées de façon excessive ou inappropriée, elles deviennent une source importante de radicaux

libérés dans le milieu environnant. Elles sont susceptibles d'entraîner des lésions tissulaires sévères, comme c'est le cas dans la FKP (49).

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un produit plus stable que les radicaux superoxydes. C'est pourquoi il diffuse très facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Il est produit en grande partie à partir du radical superoxyde en présence de superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la réaction dans le peroxysome. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires. Il est potentiellement toxique pour la cellule et il est utilisé par la myéloperoxydase pour produire de l'hypochlorite qui permet de tuer les micro-organismes pathogènes (50). Le peroxyde d'hydrogène est donc diffusible et dangereux à distance.

Bien souvent, il y a déséquilibre entre les quantités présentes de peroxyde d'hydrogène et les capacités réductrices de la catalase et du glutathion peroxydase. Il y a alors formation du radical hydroxyle (OH^*). Ce radical est très oxydant et peut initier une peroxydation lipidique en chaîne. Il peut atteindre de nombreuses molécules lipidiques insaturées au sein de la membrane cellulaire et les LDL, générant des radicaux peroxyles, des peroxydes et des aldéhydes (44). C'est le radical le plus dangereux et le plus toxique pour l'organisme.

1.2.1 Détermination de la peroxydation lipidique

Idéalement, on estime la peroxydation lipidique en mesurant la consommation d' O_2 et la perte de substrat comme conséquences directes du processus (51). Etant donné que ceci est impossible *in vivo*, la plupart des techniques utilisées s'appuient sur des mesures métaboliques de la réaction afin d'estimer cette peroxydation. Ces techniques comprennent les produits issus du dommage moléculaire. Ces métabolites peuvent émettre de la chimiluminescence et de la fluorescence (52). On compte, entre autres, les hydroperoxydes lipidiques (53), les diènes conjugués (54), les aldéhydes incluant le 4-hydroxynonéal (51), le malondialdéhyde (MDA) (55), les substances qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique et les hydrocarbures aliphatiques (56).

La peroxydation lipidique est associée à une émission de lumière issue de carbonyles excités, provenant de la réaction d'un oxygène singulet et de radicaux peroxyde (57). Le mécanisme précis par lequel cet oxygène est formé n'est pas connu. Plusieurs techniques ont été développées afin d'augmenter le rendement de chimiluminescence, étant donné que l'intensité de la lumière induite par les radicaux libres est très faible (58).

Les hydroperoxydes lipidiques représentent les métabolites majeurs du début de la peroxydation lipidique, ce qui est en fait, une mesure attrayante de peroxydation (59). Ils sont instables en présence d'ions métalliques et leur décomposition conduit à la formation de diènes conjugués et de nombreux autres produits secondaires à la réaction (60). Leur mesure dans les liquides biologiques implique la formation d'un produit fluorescent ou coloré suite à une réaction avec la peroxydase ou l'hématine (58).

Les diènes conjugués sont rapidement formés, dès que la réaction en chaîne de la peroxydation lipidique débute (61). Habituellement, leur présence prouve qu'il y a eu peroxydation (54). En présence d'O₂, ils forment des radicaux peroxy et des hydroperoxydes lipidiques. Leur production dépend des quantités relatives de lipides diénoïques et polyénoïques (62). La détermination des diènes conjugués dans les liquides biologiques est encore problématique (63).

Le 4-hydroxynonéal est un aldéhyde important formé lors de la peroxydation lipidique (64). Sa reproductibilité et sa spécificité ont par contre été mises en doute (65). Le 4-hydroxynonéal ainsi que d'autres aldéhydes sont immunogéniques et cytotoxiques à cause de la possibilité de réagir avec plusieurs espèces de molécules, dont les acides aminés (66). Il peut aussi bien inhiber la synthèse de l'ADN, des protéines et de plusieurs enzymes. La génération du 4-hydroxynonéal peut conduire à l'activation d'enzymes effectrices et résulter en la naissance de seconds messagers (67).

Le MDA est le métabolite le plus important de la peroxydation des AG polyinsaturés qui ont plus de deux doubles liaisons (44). Les principaux précurseurs

lipidiques du MDA *in vivo* sont le C20:4n-6 et le C22:6n-3 (68). Son estimation dans les liquides biologiques après formation d'un complexe avec l'acide thiobarbiturique est relativement simple. Ceci explique sa popularité (69). Mais l'interprétation des résultats est souvent difficile, surtout dans le cas du MDA urinaire qui est souvent beaucoup plus représentatif du MDA ingéré que du MDA formé (70). Certains estiment que la réaction n'est pas spécifique, qu'elle est longue, qu'elle ne mesure que les aldéhydes libres, ce qui ne reflète pas toujours adéquatement la peroxydation lipidique globale (65). D'autres pensent que cette mesure sous-estime la peroxydation comparativement à la détection spectrophotométrique des hydroperoxydes lipidiques (71). La détermination du MDA par HPLC doit demeurer la méthode de choix afin de permettre la séparation de la molécule MDA-TBA de toutes les autres molécules qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique et qui rendent la détermination très peu spécifique (72).

Les hydrocarbures aliphatiques, bien qu'ils ne représentent qu'une voie de dégradation métabolique mineure, sont d'un grand intérêt parce qu'ils peuvent être étudiés *in vivo* de façon non-invasive (73). Les hydrocarbures retrouvés dans l'air expiré, principalement l'éthane et le pentane, ont été surtout utilisés jusqu'à présent comme mesure de peroxydation lipidique dans des préparations *in vitro* et dans des études animales. Selon les études *in vitro*, les AG polyinsaturés de la famille *n-3* produisent de l'éthane (74), alors que ceux de la famille *n-6* forment du pentane lorsque soumis à la peroxydation (75). Cette méthode est par contre longue. On ne peut mesurer les alcanes que chez quelques patients par jour. Il faut de plus être très soucieux des détails techniques. Nous avons réévalué pendant plus d'un an toute la méthodologie impliquée dans ce type d'analyse. On ne peut obtenir de résultats précis et reproductibles des hydrocarbures dans l'air expiré qu'avec un matériel approprié, l'exemption de contamination par l'air ambiant, une concentration adéquate des échantillons et une technique très sensible de chromatographie en phase gazeuse (76). Une période de lavage de l'espace mort alvéolaire avec de l'air "zéro" est aussi un préalable, sans quoi les résultats sont faussés par la contamination de l'air ambiant.

1.2.2 Les antioxydants

Afin de combattre la peroxydation lipidique, il existe une panoplie de molécules de combat: les antioxydants. Les radicaux libres, produits du métabolisme aérobique, sont normalement neutralisés par un système de défense antiradicalaire sophistiqué constitué par des vitamines antioxydantes (A, C, E, β -carotène), des micronutriments (Cu, Mn, Se, Zn) et des enzymes spécialisées (superoxyde dismutase, catalase et glutathion réductase) (77).

La neutralisation obtenue est cependant incomplète et un pourcentage mineur de radicaux libres formés, environ 1%, s'en échappe. Cela pourrait expliquer le processus de vieillissement normal auquel nous sommes tous plus ou moins inexorablement soumis. Aussi, l'existence d'un déséquilibre marqué entre la production et la neutralisation des radicaux libres accroît les effets délétères de ces derniers et leurs conséquences pathologiques graves (77).

La catalase réduit le H_2O_2 en libérant de l'oxygène et de l'eau. Elle est surtout localisée dans le peroxysome (78). Elle n'élimine pas la totalité du H_2O_2 , mais son rôle est très important surtout en présence d'ions ferreux en permettant d'éliminer l'excès de peroxyde d'hydrogène afin que la réaction de Fenton ne puisse pas s'amplifier (79). La glutathion peroxydase réduit aussi le H_2O_2 ainsi que les hydroperoxydes lipidiques formés suite à la peroxydation des AG polyinsaturés (80). Pour son fonctionnement, il utilise le glutathion réduit comme cofacteur sur lequel il transfère l'oxygène, le transformant en glutathion oxydé. Dans les conditions physiologiques, le glutathion cellulaire réduit est prédominant (95%). Les glutathion peroxydases connues sont des enzymes dépendantes du sélénium (81). La nature et l'intensité du stress oxydatif peuvent entraîner une modification de leur synthèse pour une meilleure adaptation cellulaire ou une inactivation de l'enzyme.

Trois vitamines (A,C,E) et une pro-vitamine (le β -carotène), sont reconnues comme antioxydants. La vitamine E agit *in vivo* et *in vitro* en neutralisant les radicaux libres, devenant elle-même un radical non toxique (82). La vitamine E ou l' α -tocophérol est l'antioxydant liposoluble qui a la plus grande concentration

molaire cellulaire (83). Elle permet de diminuer la peroxydation lipidique dans la membrane cellulaire et au sein des LDL (84). L'oxydation des LDL est précédée d'une disparition séquentielle des antioxydants endogènes, en particulier la vitamine E et les caroténoïdes, ce qui semble confirmer le rôle protecteur de ces composés (85). Le γ -tocophérol est par contre plus efficace que l' α -tocophérol pour piéger les peroxy-nitrites (86). Dans le plasma, l' α - et le γ -tocophérol sont transportés par les VLDL (87). La vitamine E est distribuée aux cellules par une protéine de transfert (88).

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble qui peut trapper de nombreuses espèces d'oxygène contribuant au stress oxydatif (89). La réduction de la vitamine E oxydée est assurée par la vitamine C (90). Les concentrations de ces deux vitamines sont donc nécessairement liées contre la peroxydation lipidique. La vitamine C peut par contre agir comme pro-oxydant en présence d'ions métalliques de transition comme le fer et le cuivre (50). *In vivo*, elle est maintenue sous forme réduite par l'action de la déshydroascorbate réductase qui utilise le glutathion comme cofacteur (91).

Le β -carotène capte l'oxygène singulet sous faible pression d'oxygène et, comme les autres caroténoïdes, il a le pouvoir de mettre fin aux réactions en chaîne de lipoperoxydation (92). Il est un antioxydant efficace à des pressions faibles en oxygène (93), alors qu'il agit comme prooxydant à des concentrations élevées (94,95). Il protège les structures cellulaires contre l'agression oxydante: il s'oppose à la cyto- et à la génotoxicité de nombreux agents (96). Le β -carotène réussit mieux que la vitamine E à trapper l'oxygène singulet ainsi que les radicaux libres à l'intérieur des membranes parce qu'il est plus lipophile que cette dernière (97,98). Les caroténoïdes ne nécessitent pas de réaction de régénération comme la vitamine E (94). Le β -carotène trappe rapidement les radicaux libres de dioxyde d'azote (NO_2^{\cdot}), thiyl (RS^{\cdot}) et sulfonyl (RSO_2^{\cdot}) (99). Son effet antioxydant semble être très spécifique *in vivo*. Toutefois, le β -carotène ne semble pas avoir la possibilité de régénérer la vitamine E comme le fait la vitamine C (100).

La vitamine A semble avoir une capacité antioxydante spécifique aux membranes où elle se situe (101,102). Comme le β -carotène, le rétinol trappe les radicaux libres à des pressions faibles en oxygène (103). Il est moins efficace que la vitamine E pour inhiber la peroxydation des LDL mais il agit sur des liposomes en synergie avec elle (104,105).

1.3 Vitamines liposolubles

La protection des membranes biologiques contre la peroxydation lipidique nécessite la présence de vitamines liposolubles en premier lieu à cause de leur lipophilicité. Ces dernières sont absorbées avec les produits de la digestion. Seules les vitamines A et E ont une activité antioxydante, alors que les vitamines D et K servent à d'autres importantes fonctions. Le β -carotène est la pro-vitamine A et possède aussi une activité antioxydante. Tout facteur qui entrave l'absorption des lipides nuit également à l'assimilation des vitamines liposolubles.

1.3.1 Le β -carotène

Parmi tous les caroténoïdes, le β -carotène (B-C) est le plus connu, entre autre parce qu'il est le précurseur du rétinol et de l'acide rétinoïque. La diète nord-américaine fournit environ 2 mg/jour de B-C et on estime le pool total à 140 mg (106,107). Contrairement à la vitamine A, entreposée dans les cellules de Ito situées dans le foie, le β -carotène hépatique ne représente que 10% des réserves. En effet, 84% du pool se situe dans le tissu adipeux. Les niveaux sériques dépendent de la prise nutritionnelle, mais le contenu hépatique n'est pas affecté par cette supplémentation, demeurant stable, sauf en situation de déficience (108). Le β -carotène ne peut donc avoir la même toxicité hépatique que la vitamine A. Cependant 75% du β -carotène s'hydrolyse en vitamine A, après absorption entérocytaire (107).

Un des prérequis de l'absorption du β -carotène est sa prise en charge par les micelles avant d'être acheminé vers la bordure en brosse de l'entérocyte (109). Les produits de la lipolyse des lipides ingérés s'associent à la lécithine biliaire et

diététique afin de former des micelles mixtes avec les acides biliaires. Etant hydrophobe, le B-C, tout comme les lipides, est placé au centre des micelles afin de pouvoir traverser le milieu aqueux de la lumière intestinale par solubilisation micellaire (109). A cette étape, plusieurs facteurs peuvent nuire à la micellisation, la première étant le peu de lipide pour solubiliser le B-C (110). Il peut même arriver que l'absorption des lipides soit suffisante pour qu'il n'y ait aucun signe de déficience en AGE, tout en étant insuffisante pour la micellisation et l'absorption du B-C (111). La nature des acides gras alimentaires a aussi un effet sur la micellisation, ce qui se répercute sur l'absorption. Les acides gras insaturés sont mieux absorbés que les saturés en raison de leur plus grande solubilité (112). Le manque d'acides biliaires, suite à une cholestase intra ou extra-hépatique, est une seconde entrave à la micellisation du B-C. Il est reconnu qu'une telle obstruction cause la malabsorption d'environ 30% des triglycérides (113). Les produits de la lipolyse demeurent alors sous forme de vésicules plutôt que de former des disques mixtes. Ce problème de malabsorption, induit par la cholestase ou par une diminution du pool biliaire, est commun à toutes les vitamines liposolubles (114). Il faut pouvoir présenter ces vitamines sous forme aquasoluble ou encore les injecter par voie intramusculaire (115). Lorsque le flux biliaire est interrompu, il y a manque de lécithine, puisque la plus grande partie provient de la bile (109). Or c'est la lécithine, avec son caractère amphipatique, qui fournit une enveloppe pour les triglycérides, les esters du cholestérol et les vitamines liposolubles tel que le B-C.

1.3.1.1 Absorption intestinale

La forme sous laquelle les carotènes sont offerts a un effet important sur leur absorption. Elle peut être aussi faible que 1% dans le cas d'une carotte crue, alors qu'une faible cuisson augmente de beaucoup l'absorbabilité (116). L'absorption des carotènes peut aussi être diminuée lors d'une prise excessive de fibres alimentaires ou de cholestyramine, qui auront pour effet d'adsorber une grande partie de ceux-ci et des acides biliaires (117). Il faut mentionner la grande interdépendance des différentes vitamines liposolubles face à leur absorption mutuelle (118). Il existe une corrélation positive entre le niveau plasmatique de B-C et son absorption (119). Dans

des conditions normales, l'absorption des carotènes est de 10 à 50%, alors que le reste se retrouve dans les selles (106).

1.3.1.2 Phase entérocytaire

De 5 à 10 minutes après l'arrivée du B-C dans la lumière intestinale, de larges gouttelettes de lipides se forment près de la membrane des microvillosités entérocytaires. L'absorption semble être passive et sujette aux concentrations présentes (120). Une fois dans l'entérocyte, la molécule de B-C peut être absorbée sans avoir été altérée ou après avoir subi un clivage. La molécule de B-C demeure solubilisée dans les triglycérides qui participent à la formation des chylomicrons dans le réticulum endoplasmique, pour ensuite être dirigée vers l'appareil de Golgi *cis*, généralement situé près du noyau de la cellule (121). Les vésicules sécrétoires, issues de l'appareil de Golgi *trans*, fusionnent avec les membranes basolatérales et relâchent par exocytose les chylomicrons naissants dans l'espace extracellulaire et la lymphe mésentérique (109). Le B-C peut aussi être clivé au niveau de sa double liaison centrale par l'enzyme 15-15'-dioxygénase pour former du rétinol, qui pourra être réduit en rétinol (122). Ce dernier est estérifié à un AG, généralement l'acide palmitique ou stéarique (123). Les esters du rétinol sont solubilisés par les AG afin d'être inclus dans les chylomicrons.

1.3.1.3 Transport lymphatique

La lymphe, transportant les chylomicrons, est acheminée par le canal thoracique jusqu'à la veine sous-claviaire gauche, puis vers les lits capillaires des tissus périphériques (109). Aussitôt que les chylomicrons entrent dans la circulation lymphatique par les fenestrations de l'endothélium capillaire, ils subissent une série de modifications. La lipoprotéine lipase de l'endothélium des vaisseaux sanguins du tissu adipeux et du muscle, hydrolyse partiellement les phospholipides de surface, puis une partie des triglycérides au cœur du chylomicron. Le B-C et les AG libérés sont transportés vers le tissu adipeux sous-jacent par l'albumine (124). En effet, 84% du B-C est entreposé dans le tissu adipeux alors que seulement 10% se trouve dans le foie (108). Les particules résiduelles ou "chylomicron remnants" sont largement

captées par les récepteurs de LDL hépatiques, mais aussi par de nombreux autres tissus périphériques, dont la moelle osseuse (109).

1.3.1.4 Réserve hépatique

Alors que les niveaux plasmatiques de B-C reflètent les prises alimentaires, les réserves du foie sont plutôt stables (125). Le B-C est transporté à 75% par les LDL et à 25% par les HDL. Lorsque l'insulinémie est basse, le foie synthétise les VLDL et le B-C est alors inclus en son centre lipophile pour être envoyé vers les tissus périphériques. Les 2/3 de ces particules reviendront au foie en quelques heures alors que l'autre tiers sera transformé en particules plus denses, les LDL. C'est donc les LDL qui transportent à la fois 75% du cholestérol et une grande partie du B-C (126). Le contenu des différents tissus humains en carotène est loin d'être uniforme (125). Certaines personnes répondent à une supplémentation en B-C par une augmentation plasmatique, alors que d'autres ne répondent pas (127). Cette différence entre les "répondeurs" et les "non-répondeurs" est aussi notée lorsque l'on analyse la concentration en B-C de cellules de la muqueuse buccale (128). Le rat est un mauvais modèle car il absorbe très peu le B-C. Il hydrolyse la plus grande partie en rétinol (118). C'est d'ailleurs parce qu'ils n'absorbent pas les pigments des caroténoïdes diététiques, que l'on a qualifié les rongeurs, les lapins et les porcs d'animaux à graisse blanche (129).

1.3.2 Le rétinol

Le β -carotène ainsi que 37 autres caroténoïdes ont la capacité de produire du rétinol (106). Sans cette synthèse, le rétinol doit faire partie de la diète en tant qu'aliment essentiel. On le retrouve dans le tissu animal sous forme de rétinol estérifié à des AG à chaîne longue (129). C'est un alcool primaire liposoluble qui s'incorpore aux membranes et peut, s'il est présent en trop grande quantité, détruire la structure et la fonction normale de la membrane (130).

1.3.2.1 Rôles

Le rétinol est essentiel pour une croissance normale et joue un rôle prépondérant dans la vision, la reproduction, l'embryogénèse, le développement osseux, la normalité des tissus épithéliaux et la stabilisation des membranes biologiques (131). Un pour cent de cette vitamine est utilisé pour la vision (132). Une déficience en rétinol augmente aussi la susceptibilité des tissus, particulièrement épithéliaux, à la carcinogénèse. En contrepartie, son administration prévient la néoplasie induite par des carcinogènes chimiques (133). On estime entre 20 et 40 millions, le nombre d'enfants qui souffrent de déficience en rétinol. Une supplémentation quotidienne, équivalente aux quantités d'une diète normale, a diminué le taux de mortalité de 54% dans une étude comprenant plus de 15,000 enfants (134).

1.3.2.2 Absorption intestinale

Le rétinol estérifié doit d'abord être hydrolysé dans l'intestin par la cholestérol estérase pancréatique avant d'être absorbé (123). Le rétinol est absorbé par l'entérocyte à l'aide d'une diffusion facilitée et médiée par une protéine transporteuse, alors que sa diffusion est passive lors de prises pharmacologiques (135). Comme pour le B-C, la micellisation des lipides et des molécules liposolubles à l'aide des acides biliaires est essentielle à son absorption. Dans des cas de cholestase hépatique, il y a malabsorption de cette vitamine (136). Après avoir traversé la membrane apicale, il semble que le rétinol soit transporté par une protéine liante cellulaire, le CRBP-II (137). La vitamine A doit être estérifiée avant son incorporation aux chylomicrons. L'acyl CoA:rétinol acyltransférase microsomale est responsable de l'estérification du rétinol majoritairement à un AG saturé, alors que le cholestérol est pour sa part estérifié à un AG polyinsaturé (138). On retrouve des concentrations identiques de rétinol réductase, d'acyl CoA:rétinol acyltransférase et de "retinol binding protein" cellulaire dans la muqueuse intestinale, ce qui suggère une régulation coordonnée de ces 3 protéines (139).

1.3.2.3 Incorporation aux chylomicrons

Les molécules de rétinol estérifié sont solubilisées dans les triglycérides et insérées au cœur des chylomicrons par le réticulum endoplasmique. L'appareil de Golgi est responsable de l'exocytose de cette particule par la membrane basolatérale de l'entérocyte (140). Toutefois, la sécrétion lymphatique du rétinol est largement diminuée dans les cas de déficience en AGE ou en zinc (141). Ces deux composés sont essentiels à la formation des chylomicrons qui le transportent. Les "chylomicron remnants" sont reconnus par les récepteurs des tissus extrahépatiques et leur livrent sous l'effet de la lipase lipoprotéinique une faible partie du rétinol estérifié qu'ils transportent (142). Une fois l'endocytose terminée, la "retinyl palmitate hydrolase" l'hydrolyse (143). La plus grande partie du "chylomicron remnant" est captée rapidement par les récepteurs de l'hépatocyte (109). La demi-vie de cette particule lipoprotéinique est de 20 minutes (124).

1.3.2.4 Storage dans la cellule de Ito

Après l'hydrolyse du rétinol estérifié, qui semble être dépendante des acides biliaires hépatiques, le rétinol se lie au "retinol binding protein" (RBP) (144). Il se dirige vers le réticulum endoplasmique, est acheminé à l'appareil de Golgi et est sécrété de la cellule par exocytose (145). Le statut de l'individu en rétinol dicte ce qui adviendra de cette molécule à partir de cet instant (140). Les concentrations plasmatiques de cette vitamine sont hautement régulées et se maintiennent autour de 2 μ M chez l'individu sain (146). Lorsqu'elles sont suffisantes, le complexe rétinol-RBP se dirige vers la cellule de Ito dans le foie pour y être entreposé. Il semble que la CRBP soit responsable de sa captation par la cellule de Ito. Lorsque les animaux sont dans un état de déplétion, le rétinol-RBP sécrété par l'hépatocyte est alors transporté vers la circulation systémique. Par contre, lorsque les concentrations tissulaires sont normales, l'expression du gène de la CRBP est rapidement induite et celle-ci facilite l'entrée du rétinol dans la cellule de Ito (140). La lécithine:rétinol acyltransférase estérifie alors le rétinol et entrepose les molécules estérifiées sous forme de gouttelettes lipidiques (147).

1.3.2.5 Sortie des cellules de Ito

Le foie ne sert pas seulement de réserve au rétinol, mais il régularise aussi sa sécrétion dans la circulation sanguine à la demande des tissus extra-hépatiques (148). Le rétinol estérifié est alors hydrolysé et le rétinol doit se lier au RBP avant sa sortie de la cellule de Ito. Dans les cas de cirrhose biliaire, bien que les quantités de RBP hépatique soient suffisantes, le complexe ne peut sortir de la cellule, produisant une diminution du taux plasmatique de vitamine A (149). Il peut aussi se produire que les taux de RBP synthétisé soient insuffisants pour transporter cette vitamine, créant ainsi une hyporétinolémie qui peut même être concomitante à une hypercaroténémie (150). Dans des cas normaux, le complexe qui quitte le foie, se lie à la transthyrétine ou préalbumine. Plus de 95% du rétinol-RBP sanguin est lié à celle-ci. Cette liaison stabilise l'association du rétinol avec le RBP et prévient aussi la filtration glomérulaire du RBP (151). Lorsque le complexe s'approche du tissu nécessitant du rétinol, il doit se dissocier (142).

1.3.2.6 Transport extra-hépatique

Le mécanisme par lequel le rétinol est transféré du RBP extracellulaire à la cellule cible est controversé. Deux modèles ont été proposés. Dans le premier, il est envisagé que les cellules cibles expriment des récepteurs de surface cellulaire spécifiques qui reconnaissent et lient le RBP. On pense que le récepteur RBP facilite sa livraison aux cellules cibles sans que le RBP soit internalisé lui-même. Plusieurs études ont fourni certaines évidences expérimentales supportant l'existence de récepteurs de surface cellulaire au RBP. Un second modèle propose que la livraison du rétinol à la cellule par le RBP se produit indépendamment d'un récepteur. Il serait relâché lentement dans la phase liquide par le RBP, et s'associerait par la suite à la cellule (152). De cette façon, les cellules seraient supplémentées par un apport lent mais constant en rétinol et seraient protégées d'une accumulation rapide et potentiellement toxique qui surviendrait en l'absence de RBP (146).

1.3.2.7 Hypervitaminose A

Face aux grandes fluctuations diététiques de cette vitamine, sa sécrétion contrôlée par le foie est un élément clé dans la régulation des concentrations plasmatiques. Le foie thésaurise le rétinol, parce qu'il est capable d'en entreposer une grande quantité lorsque les apports sont considérables et peut satisfaire aux besoins de l'organisme en cas d'une consommation insuffisante. L'homéostasie plasmatique semble être parfaite. Ceci a par contre le désavantage de ne pouvoir nous renseigner adéquatement sur le pool hépatique en vitamine A. En effet, des concentrations hépatiques disproportionnées par rapport aux niveaux sanguins peuvent exister. Cette vitamine est toxique à des concentrations élevées (130). L'hypervitaminose A peut augmenter les triglycérides plasmatiques et conduit à la stéatose hépatique (151). L'élévation du niveau de rétinol estérifié plasmatique est plus représentative du statut hépatique que le niveau du rétinol et du RBP. Ces deux derniers peuvent même être abaissés dans un cas d'hépatotoxicité par cette vitamine (153). En effet, lorsque la capacité de stockage des cellules de Ito est saturée, une quantité substantielle de rétinol estérifié demeure dans la circulation pour un certain temps (149). La forme estérifiée peut alors représenter plus de 30% du rétinol circulant comparativement à moins de 5% chez les témoins (154). Cette augmentation n'apparaît en général qu'en cas d'hypervitaminose A.

1.3.3 La vitamine E

On retrouve 8 différentes formes de vitamine E dans la nature. Les formes α -, β -, γ - et δ -tocophérol ont un anneau chromanol et une queue phytyl alors que les formes α -, β -, γ - et δ -tocotriénol ont une queue insaturée (155). Elles n'ont pas toutes les mêmes activités biologiques et antioxydantes. Ainsi, le γ -tocophérol ne possède que le dixième de l'activité biologique de l' α -tocophérol (156). En 1922, Evans et Bishop ont rapporté que des rats déficients en vitamine E avaient des problèmes de reproduction. On a émis l'hypothèse qu'une telle déficience pouvait être responsable de plusieurs pathologies dont la dysplasie bronchopulmonaire, l'hémorragie

intracrânienne et l'anémie du prématuré (157). Pourtant, la supplémentation en vitamine E n'a pu empêcher ces problèmes (158).

1.3.3.1 Absorption intestinale

Comme le β -carotène et le rétinol, l' α -tocophérol utilise des mécanismes de transport spéciaux dans les milieux biologiques aqueux tels que le plasma et les cellules à cause de son hydrophobicité. Par contre, cette vitamine liposoluble ne semble pas posséder de transporteur protéique au niveau de l'entérocyte. Elle est plutôt transportée par les lipoprotéines plasmatiques et sa distribution suit celle des lipides totaux (159). On évalue son absorption à 70% chez l'humain (160). Il n'existe aucune compétition entre l' α et le γ -tocophérol durant leur phase absorbative (161). La présence d'acides biliaires est nécessaire à la formation de micelles, sans lesquelles l'absorption de la vitamine E est inhibée. Des études l'ont démontré chez des rats avec une ligature du canal biliaire (162) et chez des enfants atteints de cholestase hépatique (163).

1.3.3.2 Transport extra-hépatique

Suite à son absorption, la vitamine E est redistribuée aux tissus par le foie à l'aide des VLDL transporteurs des lipides (87). On pense qu'une protéine de liaison est responsable de son incorporation aux VLDL (164). Cette protéine semble essentielle à la régulation des concentrations plasmatiques, puisque les taux de vitamine E sont très faibles chez les patients qui n'ont pas cette protéine de liaison (165). Si on donne à des sujets de fortes doses d' α -tocophérol, dépassant largement les besoins quotidiens, les concentrations plasmatiques n'augmentent que très peu (166). Il semble que toute quantité ingérée dépassant la capacité de liaison de cette protéine de transport soit aussitôt excrétée dans la bile (167). Contrairement aux autres vitamines liposolubles, la vitamine E n'est pas toxique lorsqu'ingérée à fortes doses (168), sans doute parce qu'elle n'est pas entreposée au foie (169). Le taux plasmatique de l' α -tocophérol est le reflet de son taux tissulaire (170).

1.4 **Les acides biliaires**

L'absorption des acides gras nécessite trois étapes majeures: l'émulsification des lipides par les acides biliaires, suivie des phases digestive et absorptive. Soumis à des pressions mécaniques et à la lipolyse gastrique, les lipides ingérés produisent des particules plus petites qui entrent dans le duodénum (109). Etant alors mélangées à la bile et au bicarbonate de sodium, ces gouttelettes lipidiques subissent l'émulsification. Les petites sphères, ou particules laminaires du mélange de lipides émulsifiés, sont appelées micelles. Les micelles offrent une surface beaucoup plus grande que les lipides non émulsifiés; ceci permet à beaucoup plus de molécules de triglycéride d'interagir avec les lipases à l'interface eau-lipide. Cette réaction rend alors possible la seconde étape qui est l'hydrolyse des lipides par les enzymes pancréatiques (109). Les métabolites peuvent alors être absorbés dans le jéjunum.

L'hydrolyse duodénale complète des lipides nécessite le déroulement concomitant d'événements physicochimiques complexes impliquant la lipase pancréatique, la colipase, la phospholipase A₂ et la sécrétion biliaire dans un environnement où le pH doit être voisin de la neutralité. Les produits de la lipolyse sont ensuite véhiculés à travers la "couche d'eau non remuée" jusqu'à la membrane microvillositaire grâce à la présence d'acides biliaires (AB) ionisés qui doivent être présents en concentrations suffisantes pour former des micelles (171). La vésicule biliaire se contracte à chaque repas et les AB sont sécrétés dans le duodénum. Ils sont réabsorbés activement au niveau de l'iléon (172). Ils retournent au foie où ils sont extraits et sécrétés dans la bile qui est entreposée dans la vésicule biliaire. On retrouve deux AB primaires chez l'homme: les acides cholique et chénodéoxycholique qui sont conjugués à la glycine ou à la taurine (172).

En raison de la pression osmotique qu'ils exercent et de leurs propriétés hydrophiles, conférées aux groupes OH⁻, les acides biliaires di- et tri-hydroxylés sont cholérétiques. La force osmotique qu'ils exercent dans le canalicule permet de retirer de l'eau du compartiment plasmatique *via* les jonctions serrés. Tous les AB n'ont pas la même activité osmotique et leur influence sur la sécrétion d'eau varie selon les

espèces moléculaires (173). Ainsi l'acide chénodéoxycholique est peu cholérétique; il est de plus, mal éliminé par le foie puisque les récepteurs membranaires ont, à son égard, une faible capacité de transport. Lorsqu'il y a atteinte de la sécrétion biliaire il y a accumulation d'acide chénodéoxycholique dans l'hépatocyte. Ceci peut se traduire par une cholestase ou une cytolysse à un stade plus avancé (173).

Les AB jouent deux rôles opposés dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol (CH). Ils sont d'une part les produits finaux du catabolisme du CH, et de ce fait, leur biosynthèse et leur excrétion servent à diminuer les niveaux de CH hépatique. D'autre part, la présence des AB dans la lumière intestinale facilite la solubilisation du CH et des graisses diététiques, améliorant ainsi l'absorption de ces nutriments essentiels (174). Ils participent ainsi à l'augmentation des niveaux du pool total de CH. Ces observations nous suggèrent que la production des AB par le foie est soumise à un contrôle sévère ayant pour but de balancer ces deux fonctions antagonistes.

1.4.1 L'acide ursodéoxycholique

Quoique di-hydroxylé et isomère de l'acide chénodéoxycholique, l'acide ursodéoxycholique (AUDC) est plus hydrophile que ce dernier et est par le fait même mieux transporté par le foie. Contrairement à l'acide chénodéoxycholique, l'AUDC est cholérétique (175). Pourtant seule la position du groupement hydroxyl, en α ou en β , différencie ces deux AB. Ce sont donc des molécules dont le comportement physiologique est étroitement lié à leurs propriétés physiques. L'acide chénodéoxycholique a une plus grande aptitude à pénétrer les lipides disposés en monocouche ou en bicouche, et à entraîner éventuellement leur rupture (172). L'acide chénodéoxycholique est membranolytique alors que l'AUDC, moins tensioactif, ne l'est pas.

La supplémentation en AUDC a permis d'améliorer les épreuves de fonction hépatique aussi bien chez l'enfant (176-178) que chez l'adulte atteint d'hépatopathies chroniques (179-181). Les mécanismes d'action sont à l'étude mais les effets bénéfiques s'exercent en vertu des propriétés suivantes: (1) action cholérétique en

augmentant le flux biliaire dépendant des AB (175); (2) rôle "hépatoprotecteur" en remplaçant les AB plus hydrophobes et toxiques (182,183); (3) activité immunomodulatrice (184).

Le traitement de cellules hépatocytaires par l'AUDC empêche la nécrose causée par l'addition d'acide chénodéoxycholique et diminue l'incorporation d'AB toxiques dans les membranes mitochondriales (185,186). Il diminue aussi le stress oxydatif puisqu'il inhibe l'induction du NO synthase (187,188).

1.5 La Fibrose Kystique du Pancréas

Les enfants atteints de la Fibrose Kystique du Pancréas ont une malabsorption des lipides, causant une stéatorrhée. L'absorption des lipides est contrecarrée dans ses trois étapes nécessaires: l'émulsification des lipides par les acides biliaires, l'étape lipolytique et la phase absorptive. En effet, la première étape est anormale parce que les sécrétions d'acides biliaires et de bicarbonate de sodium sont diminuées. La surface des micelles est d'autant moins grande, offrant ainsi un contact plus restreint des triglycérides avec les lipases pancréatiques. De plus, la colipase, la lipase pancréatique et la phospholipase A₂ sont absentes chez la plupart des patients (189). La phase digestive est alors, sinon absente, du moins très limitée. Quoique la phase absorptive des lipides ait été beaucoup moins étudiée, il y a certaines évidences suggérant certaines anomalies. Malgré une supplémentation en enzymes pancréatiques, environ 15% des patients FKP ont une stéatorrhée de plus de 15 g lipide/jour comparativement à moins de 2 g/jour pour les témoins.

Parmi les maladies génétiques de la population caucasienne à issue potentiellement fatale, la FKP est la plus fréquente. On la connaît sous le nom de mucoviscidose en Europe. En Amérique du Nord, une personne sur 2000 en est atteinte et on estime qu'une personne sur 20 est porteuse de cette maladie (190). Cette prévalence des porteurs est expliquée par la loi de la génétique des populations de Hardy-Weinberg: $p^2+2pq+q^2$, où p représente les gens non porteurs, q les homozygotes et pq les hétérozygotes (191). L'incidence est moins élevée chez les

habitants de certains pays d'Europe du Nord et chez les orientaux. Enfin, les Noirs Africains et les Mongoliens ne connaissent pratiquement pas cette maladie.

Le mérite revient à A. Fanconi d'avoir décrit les premiers cas cliniques de FKP en 1928 et de les avoir différenciés du "syndrome coeliaque" (192) et à Andersen d'avoir décrit la pathologie pulmonaire caractéristique à l'autopsie (193). Ce n'est qu'au début des années cinquante que la description et la compréhension clinique de la maladie furent mieux connues. Depuis, les progrès effectués dans notre connaissance de la FKP ont été considérables. Grâce à cette évolution, la survie moyenne des patients est passée de 6 mois à la fin des années cinquante (194), à plus de 30 ans pour la moitié des patients (195).

1.5.1 Génétique

La FKP est une maladie génétique à transmission autosomale récessive. Le gène de la FKP ne fut cloné qu'en 1989 à Toronto et est localisé sur le chromosome 7 (196). L'anomalie moléculaire la plus fréquente est la ΔF 508 caractérisée par la suppression d'un résidu acide aminé phénylalanine au codon 508 sur l'exon 10. Cette mutation est la plus commune en Amérique du Nord et est présente chez 71% des patients au Québec (197). Plus de 600 mutations différentes ont été identifiées à ce jour (198). Ces mutations résultent en l'absence ou le dysfonctionnement de la protéine produite par ce gène, le "cystic fibrosis transmembrane regulator" (CFTR) (199). Ce gène comprend environ 250,000 paires de base (200). Il existe une relation entre le CFTR et le niveau élevé de Cl^- dans la sueur, la seule anomalie biochimique reproductible (201).

1.5.2 Présentation clinique

Le tableau clinique que présentent les patients peut différer suivant l'âge auquel la maladie s'exprime. Dans la période néonatale, le premier signe est principalement l'iléus méconial, diagnostiqué chez environ 10% des patients (200). La toux et la bronchite obstructive sont souvent le signe d'alarme, mais les problèmes digestifs tels la distension abdominale, le retard staturo-pondéral et la présence de

selles graisseuses sont les signes les plus symptomatiques. La dysmotilité intestinale, le déficit d'apport nutritionnel et l'insuffisance pancréatique sont directement responsables de ces manifestations (190).

1.5.3 Diagnostic

Malgré les nouveaux moyens diagnostiques, la technique standard reste le test de la sueur, basé sur l'augmentation de concentration en électrolytes dans la sueur des patients atteints, tant dans l'enfance qu'à l'âge adulte (202). Ce test nécessite de 75 à 200 mg de sueur après induction d'une iontophorèse à la pilocarpine (203). On dose le chlore et le sodium. Des valeurs de plus de 60 nmoles/L sont considérées comme anormales (200). Le diagnostic est habituellement confirmé par l'analyse directe des principales mutations et par la mesure de la trypsine immunoréactive qui est aussi utilisée dans plusieurs pays pour le dépistage systématique de la maladie. Le taux sérique de trypsinogène immunoréactif est très élevé chez les nouveau-nés atteints de FKP (204). Le trypsinogène est une pro-enzyme transformée en trypsine par l'entérokinase. L'élévation de son taux sanguin à la naissance traduit une libération circulatoire par suite de l'obstruction des canalicules et des acini pancréatiques. La réduction du taux sérique après la naissance correspond à une réduction fonctionnelle du pancréas. Les taux sanguins de trypsinogène atteignent leur maximum dès la fin du deuxième trimestre de la vie fœtale (204).

1.5.4 Manifestations pulmonaires

La perte de conductivité trans-membranaire du canal chlore réduit la sécrétion de cet ion, du sodium et de l'eau, produisant des sécrétions déshydratées et visqueuses (205). Ceci conduit à une obstruction de l'arbre bronchique (206). En raison d'un mucus épais et déshydraté entraînant une clairance mucociliaire diminuée au niveau des voies aériennes, les patients développent une maladie qui est caractérisée par des infections bronchiques récidivantes menant à leur tour à un remaniement des voies aériennes d'abord de petit, puis de grand calibre. Dans un stade ultime, une insuffisance pulmonaire s'installe et rend compte de 90% des décès

des patients (205). Ce développement est dû à l'effet combiné des bactéries et des mécanismes de défense de l'hôte (207). La principale caractéristique dans la FKP est donc un mucus déshydraté couplé à une surabondance de protéases intraluminales et de DNA (208). Ces protéases sont produites par des neutrophiles et des bactéries et le DNA provient des cellules desquamées. Ces enzymes hydrolysent des protéines de structure importantes au niveau des voies aériennes et du poumon telles que l'élastine, les protéoglycans et le collagène. Ceci entraîne une instabilité des parois bronchiques et les bronchiectasies (209). Le traitement intensif de la maladie pulmonaire est essentiel dans la FKP. La physiothérapie respiratoire est très importante afin de drainer les expectorations et de maintenir une bonne souplesse de la cage thoracique. L'autre volet du traitement est constitué par la thérapeutique antibactérienne qui doit être spécifique (210). La biotechnologie a permis la mise au point d'une DNase recombinante humaine qui, administrée par aérosol, a des effets mucolytiques considérables. Chez certains groupes de malades, on observe une réduction de la dyspnée et surtout une spectaculaire amélioration des paramètres ventilatoires de 10 à 20%, après seulement 7 jours d'aérosolthérapie (211).

1.5.5 Manifestations gastro-intestinales

Les pathologies affectant le tractus gastro-intestinal peuvent également influencer négativement la morbidité et la courbe de survie, exactement comme le font les anomalies pulmonaires. Parmi celles-ci, il y a principalement l'insuffisance pancréatique exocrine (193). Elle est due à des modifications histologiques précoces avec obstruction des canalicules de petite taille par des sécrétions visqueuses et par des résidus cellulaires induisant une fibrose rapidement progressive (200). Les îlots de Langerhans sont, par contre, longtemps épargnés au cours de ce processus destructif. Un faible pourcentage (5%) de patients avec FKP conservent une fonction pancréatique avec des concentrations essentiellement normales d'enzymes pancréatiques. Toutefois, le défaut fondamental entraîne une sécrétion insuffisante de NaHCO_3 (212). L'insuffisance pancréatique se manifeste déjà chez 85% des patients au diagnostic et est présente chez 95% d'entre eux avant l'âge de 12 ans (213). Les premières manifestations cliniques apparaissent sous forme de diarrhée avec

malabsorption des lipides et des protéines (200). L'insuffisance pancréatique est traitée depuis longtemps par les prescriptions d'enzymes substitutives. Il faut malheureusement admettre que, malgré le recours aux enzymes pancréatiques, 25% des patients ont toujours une stéatorrhée de plus de 15 g/jour. Celle-ci entraîne une diminution de la fonction pulmonaire et hypothèque la survie surtout des filles (195,214). Bien que celles-ci prennent plus de suppléments pancréatiques que les garçons, elles consomment moins de lipides que ces derniers et leur apport calorique quotidien est inférieur au leur (215). Les patients qui ont des apports énergétiques sub-optimaux sont plus à risque d'avoir un poids insuffisant. Or, les patients FKP de faible poids ont une atteinte pulmonaire plus sévère, entraînant un déclin de leur longévité (195).

1.5.6 Complications hépato-biliaires

Les manifestations hépatiques sont rares chez les jeunes patients, mais atteignent un pic durant l'adolescence (216). Elles existent chez 20% à 50% des patients et augmentent avec l'âge (217). Une étude a rapporté un scan hépatique anormal chez 40% des patients âgés de plus de 16 ans, ainsi que des niveaux élevés de γ GT chez 50% d'entre eux (218). Il existe trois fois plus de garçons atteints que de filles (216) et il n'y a pas de prévalence génétique (219). Les anomalies consistent en une stéatose hépatique, une atteinte inflammatoire des voies biliaires intrahépatiques, une sténose du cholédoque dans son trajet intra-pancréatique et une cirrhose biliaire focale qui pourra conduire éventuellement à une cirrhose multilobulaire avec hypertension portale (220,221). La stéatose hépatique est probablement en relation avec la malnutrition et touche le tiers des patients (222). En vieillissant, les maladies hépatiques ajoutent à la morbidité de la maladie et affectent sérieusement l'espérance de vie chez plusieurs patients.

Les acides biliaires sont essentiels pour une solubilisation adéquate des gouttelettes hydrophobiques de triglycérides et pour la micellisation des produits de la lipolyse dans le duodénum. Ils sont aussi responsables du balayage des protéines adsorbées d'origine endogène ou exogène qui se situent à l'interface eau-huile (172).

La vésicule biliaire se contracte au moment des repas et déverse dans le duodénum les acides biliaires nécessaires à la micellisation des lipides pour leur absorption intestinale (172). Le pool des acides biliaires (AB) est diminué chez les patients FKP car ils sont moins bien absorbés par l'iléon, une large proportion étant excrétées avec les selles (223). Le profil de conjugaison est aussi changé: il y a prédominance des acides biliaires conjugués à la glycine et diminution de ceux qui sont liés à la taurine (202). Comme les glycoconjugués sont surtout absorbés à la partie proximale du petit intestin, ils sont peu disponibles pour favoriser l'absorption des lipides. En raison de la contraction du pool des acides biliaires, la bile peut donc être lithogénique et conduire à une lithiase vésiculaire qui est aussi en rapport avec la production de calculs de bilirubinate de calcium. Les triglycérides, les phospholipides, les protéines non hydrolysées, les résidus diététiques, une précipitation acide, une flore fécale anormale, ainsi qu'un défaut spécifique dans l'absorption iléale, ont tous été impliqués comme cause potentielle de cette malabsorption des acides biliaires (171). Ces différents problèmes hépto-biliaires ont pour conséquence de diminuer l'absorption des lipides, importante source calorique et seule source d'acides gras essentiels (AGE). La relation entre la déficience en AGE et l'atteinte hépatobiliaire en est une d'association. La déficience en AGE contribue à la stéatose hépatique, infiltration lipidique commune chez les FKP (222). De plus, une étude a montré que la supplémentation en AGE ralentit la détérioration de la fonction hépatique (224).

1.5.7 Malnutrition et besoins énergétiques

Un retard statural et plus particulièrement pondéral est fréquemment rencontré (225). L'importance de l'anorexie a été mise en évidence par la démonstration que l'apport calorique spontané des patients est d'environ 80% de la norme recommandée pour l'âge (226). On a associé cette observation à la prescription de régimes pauvres en graisse, mais même avec les diètes actuelles beaucoup plus libérales, ce problème a peu changé (227). L'anorexie est, semble-t-il, liée à l'infection pulmonaire chronique, aux douleurs abdominales et aux diarrhées, ainsi qu'à une altération du goût des aliments, soit par la présence excessive d'expectorations, soit par des déficiences en micronutriments tel que le zinc.

L'importance des difficultés psychosociales ne doit pas non plus être sous-estimée et conduit souvent à une diminution secondaire de l'apport calorique spontané (228).

L'Organisation mondiale de la santé recommande pour les enfants atteints de FKP un régime dense en calories apportant de 120% à 150% des apports normalement recommandés (229). L'accroissement des dépenses énergétiques au repos est attribuable d'une part au défaut de base (230) et d'autre part à l'effort respiratoire augmenté, ainsi qu'aux infections chroniques (231). Ce but peut être atteint soit par des apports spontanés, soit en donnant des suppléments nutritionnels en préparation orale, par sonde nasogastrique ou par gastrostomie. Enfin, on peut recourir à la nutrition parentérale périphérique ou centrale en dernier recours. Les hydrates de carbone sont une source importante d'énergie, mais leur utilisation a certaines limitations théoriques puisque de 8 à 12% de la population FKP souffre de diabète (200). Les lipides doivent représenter 35% à 40% du contenu énergétique total (231). Une attention toute particulière doit être donnée aux apports en acides gras essentiels. L'effet bénéfique de la renutrition sur la fonction pulmonaire a été clairement démontré, puisqu'une absorption lipidique normale (214) et des thérapies nutritionnelles améliorent le pronostic respiratoire, ainsi que le pronostic général des patients (232).

1.6 **Le Peroxysome**

Les peroxysomes (PER) sont des organites intracellulaires très répandus dans le monde végétal et animal (233). De Duve les découvrit en 1965 (234). Ils étaient originellement considérés comme des reliquats utilisés pour le métabolisme de l'oxygène chez les ancêtres des cellules eucaryotes et ne trouvaient aucune utilité dans les organismes plus évolués. Cette conception a prévalu jusqu'au jour où Goldfischer et collaborateurs constatèrent que le foie et le rein d'enfants souffrant du syndrome cérébro-hépatorenal de Zellweger en étaient dépourvus (235). La cellule adapte leur nombre, leur grosseur et leur contenu aux besoins métaboliques des tissus et de l'organisme (236). Beaucoup de maladies affectant l'intégrité des PER ont permis d'identifier des anomalies dans leur biogénèse et leur assemblage, ainsi que

des déficiences enzymatiques particulières modifiant leur mode d'action (237). Une dysfonction peroxysomiale accompagne parfois certaines pathologies mitochondriales (238). Elle peut également survenir à la suite de certaines déficiences métaboliques engendrées par la malnutrition (239).

Les acides gras, les stéroïdes, les acides dicarboxyliques, les prostaglandines, les acides aminés et les radicaux libres de l'oxygène sont tous des substrats de l'activité métabolique des peroxysomes (240,241). Ces organites cellulaires sont aussi impliqués dans la synthèse de constituants cellulaires importants tels les plasmalogènes, le cholestérol, les acides biliaires et l'acide docosahexanoïque (242,243). Ils jouent un rôle de seconds messagers dans la régulation des concentrations tissulaires de radicaux libres (244).

Chez les mammifères, plus de la moitié des enzymes peroxysomiales sont impliquées dans le métabolisme des lipides. Toutes les enzymes peroxysomiales investiguées jusqu'à ce jour sont localisées à l'intérieur de l'organelle si ce n'est l'acyl-CoA synthétase, protéine intégrale de la membrane dont le site catalytique fait face au cytosol (245). La plupart des enzymes sont solubles dans les matrices protéiques. D'autres le sont dans les protéines nucléaires ou membranaires. Les sites catalytiques du peroxysome font alors face à la matrice. Il semble présentement établi que les peroxysomes se forment par division à partir de peroxysomes préexistants après incorporation post-traductionnelle des protéines peroxysomiales, et non à partir du réticulum endoplasmique (246).

1.6.1 β -oxydation des acides gras

Au début du siècle, des expériences de nutrition réalisées par Knoop et collaborateurs ont fourni la preuve que les acides gras sont dégradés au cours d'une série de réactions par la voie de β -oxydation. Il s'agit d'un étalage à répétition d'unités dicarbonées. Afin d'établir la preuve, il a nourri des rats avec des acides gras dont le carbone ω était substitué par un groupe phényle. Quand le dérivé phényle contenait un acide gras à nombre pair d'atomes de carbone, l'oxydation laissait le phénylacétate comme produit final. Au contraire, les dérivés phényle d'acides gras à

nombre impair d'atomes de carbone se dégradent jusqu'au benzoate. La production d'unités dicarbonées à partir d'acides gras est appelée β -oxydation, car la liaison rompue est située entre le C_α et le C_β . Cinquante années ont passé avant que Lynen et Reichart démontrent que le fragment dicarboné de la β -oxydation n'était pas l'acétate, mais l'acétyl CoA (247).

La β -oxydation requiert l'activation préalable de l'acide gras sous forme de dérivé CoA. Un cycle de β -oxydation consiste en quatre étapes successives au terme desquelles l'acyl-CoA est raccourci de deux atomes de carbone (240). L'acyl-CoA raccourci peut subir la même série de transformations et perdre à son tour deux autres éléments de son squelette carboné. Cette succession de cycles de β -oxydation réalise une véritable spirale dans laquelle l'acide gras s'engouffre pour y être découpé en unités de deux atomes de carbone. Dans les mitochondries, les unités d'acétyl-CoA produites servent à la production d'ATP par phosphorylation oxydative pour satisfaire aux besoins du muscle ou à la cétogénèse, synthèse des corps cétoniques. L'acétyl-CoA est alors converti en acétoacétate, puis transformé en β -hydroxybutyrate et acétone, appelés par tradition "corps cétonique" (240). L'utilisation des corps cétoniques est ajustée à la demande selon les fluctuations journalières de la glycémie. Si le glucose sanguin baisse, le taux d'insuline s'abaisse. C'est alors que les corps cétoniques sont exportés du foie vers le tissu musculaire où ils serviront de source d'énergie.

Quoique semblable au système mitochondrial correspondant, la β -oxydation peroxysomiale en diffère toutefois par de nombreux aspects: 1) Les enzymes responsables de la β -oxydation sont des protéines différentes 2) La β -oxydation peroxysomiale ne dégrade pas complètement les AG, ne catalysant qu'un nombre limité de cycles de la β -oxydation 3) La β -oxydation peroxysomiale n'est pas couplée à la phosphorylation oxydative et est ainsi moins efficace que la β -oxydation mitochondriale si on considère la conservation énergétique 4) Les peroxysomes sont responsables de la β -oxydation des AG à chaîne très longue ($\geq C_{24}$), des AG dicarboxyliques, des AG ayant un groupement méthyl latéral, des prostaglandines,

des leucotriènes et des chaînes latérales carboxyliques des précurseurs d'acides biliaires. Les mitochondries pour leur part, produisent une β -oxydation des AG à chaîne longue (C16 à C22) constituant une source majeure de carburant métabolique (248). Si la contribution peroxysomiale à leur oxydation est considérée comme mineure, il faut néanmoins mentionner une certaine préférence du peroxysome pour le métabolisme des acides gras polyinsaturés (249,250). Ils sont très lentement oxydés par la mitochondrie et en sont parfois des inhibiteurs (251). Non seulement la β -oxydation peroxysomiale est plus active sur les acides gras insaturés que sur les substrats saturés, mais le peroxysome contient les trois enzymes auxiliaires requis pour leur catabolisme (250). Une autre spécialisation du peroxysome est l'oxydation des AG à très longue chaîne, substrats que la mitochondrie ne peut dégrader étant dépourvue de la coenzyme A synthétase. Ce premier enzyme du métabolisme de la β -oxydation peroxysomiale est spécifique pour les AG à très longue chaîne (252). Il est classiquement admis que le peroxysome raccourcit les acides gras à chaîne longue et très longue, lesquels seront ultérieurement oxydés par la mitochondrie (240).

Une déficience de l'oxydation des acides gras à très longue chaîne est associée à l'augmentation de la concentration tissulaire ou plasmatique de ces substrats peroxysomiaux. Pour les acides gras à très longue chaîne on utilise les rapports de concentration de l'acide cérotique (C26:0) et de l'acide béhénique (C22:0). Tout défaut dans l'oxydation des acides gras à très longue chaîne sera caractérisé par une augmentation du rapport C26:0/C22:0 parce que le C26:0 dépend de la β -oxydation peroxysomiale alors que la mitochondrie est responsable de la β -oxydation du C22:0 (253). Le rapport de l'acide lignocérique (C24:0) et de l'acide béhénique, C24:0/C22:0 est souvent conjointement utilisé au rapport C26:0/C22:0 afin de caractériser le taux tissulaire ou plasmatique des acides gras à très longue chaîne (254).

1.6.2 Biosynthèse des plasmalogènes

Dans les glycérophospholipides, les queues hydrocarbonées peuvent être couplées autrement que par une liaison ester. Les plasmalogènes sont des glycérophospholipides dont le groupe C-1 du glycérol-3-phosphate est relié à sa chaîne hydrocarbonée par une liaison vinyléther (255). L'éthanolamine est le plus souvent estérifié au groupe phosphate des plasmalogènes. Les cellules du muscle et du système nerveux périphérique contiennent une grande quantité de plasmalogènes. Ils représentent 10% des phospholipides du système nerveux central chez l'homme (256).

La biosynthèse des éthers phospholipidiques provient tout d'abord de l'anabolisme des triglycérides et des esters phospholipidiques. L'adjonction d'un premier groupement acyl au glycérol-3-phosphate le transforme en lysophosphatidate, et l'acide phosphatidique naît de l'ajout d'une seconde molécule. Cette molécule résultante est un intermédiaire commun à la formation des triglycérides et des esters phospholipidiques (255). Les produits terminaux formés de cet anabolisme sont pour la plupart des plasmalogènes. Les travaux remarquables de Hajra et collaborateurs démontrèrent que la formation du lien éther de ces phospholipides sont de nature peroxysomiale (257,258). La dihydroxyacétone phosphate acyltransférase et l'alkyl-dihydroxyacétone phosphate synthase sont des enzymes localisées du côté interne de la membrane peroxysomiale, alors que l'acyl-CoA réductase est située dans la matrice du peroxysome (259). Le peroxysome ne contient que les enzymes catalysant les réactions initiales de la biosynthèse des plasmalogènes. Le 1-alkyl-dihydroxyacétone-phosphate est par la suite acheminé vers le réticulum endoplasmique pour parfaire sa formation (258,260). Les mécanismes de transport des enzymes peroxysomiaux impliqués dans l'initialisation de la biosynthèse des plasmalogènes demeurent encore peu connus (261).

L'existence des plasmalogènes fut reconnue bien avant la connaissance de leur formule chimique exacte. C'est en 1924 que Feulgen et Voit rapportèrent la présence de substances réagissant positivement à la réaction de Feulgen dans le

plasma. Le nom de plasmalogènes leur fut donné car le principe de la méthode cytochimique est la mise en évidence de leurs groupements aldéhydes de ribose et de déoxyribose après hydrolyse en milieu légèrement acide. Les éthers phospholipidiques représentent 20% des phospholipides totaux du corps humain (255). Au cours de l'embryogénèse et de la myélinisation du cerveau, le pourcentage des phospholipides sous forme d'éther phospholipidique augmente pour avoisiner les 40% (255). Mis à part leur rôle d'activateur plaquettaire, leur fonction biologique demeure peu comprise (262). Comme les éthers phospholipidiques sont plus abondants dans le myocarde et le système nerveux central et périphérique, ils ont parfois été proposés comme support indispensable à la conduction électrique. Les plasmalogènes sont presque totalement absents des cerveaux et des cœurs de bébés morts du syndrome de Zellweger et ils sont en partie responsables des désordres neurologiques (263). On a récemment démontré une forte baisse des plasmalogènes chez les malades souffrant de maladie d'Alzheimer. On les croit en partie responsables de ce désordre neurodégénératif (264).

1.6.3 L'acide phytanique

Chez les mammifères, l'acide phytanique (acide 3,7,11,15-tetraméthylhexadécanoïque) a une origine presque exclusivement alimentaire et il ne peut être produit par une synthèse *de novo* (265). Il peut être ingéré tel quel, ou sous forme de son précurseur, le phytol, estérifié dans la molécule de chlorophylle (240). La présence d'un groupement méthyle en position β empêche toute β -oxydation directe de l'acide phytanique. Une α -oxydation est en fait préalablement requise. L'acide phytanique est transformé en acide α -hydroxyphytanique, ultérieurement converti en acide pristanique et en CO_2 (266,267). A l'opposé de l'acide phytanique, l'acide pristanique est sous sa forme estérifiée au coenzyme A, un bon candidat pour la β -oxydation (266,267). L'activité décarboxylante dépend de l'action de la phytanate oxydase (268,269). L'acide phytanique doit préalablement être activé en phytanoyl-CoA sur la surface externe de la membrane peroxysomiale, avant de traverser celle-ci pour ensuite subir une α -oxydation en acide pristanique dans la matrice peroxysomiale (270). La présence de groupements méthyles sur cet AG

empêche sa conversion en phytanoyl carnitine, liaison nécessaire pour sa translocation dans la mitochondrie (271). On connaît présentement trois types de déficits enzymatiques susceptibles d'engendrer une activité réduite de la phytanate oxydase: la déficience en phytanate α -hydroxylase (maladie de Refsum adulte) (272), en L- α -hydroxyphytanate oxydase (maladie de Refsum infantile), les maladies peroxysomiales à déficience enzymatique multiple (273) et la déficience en α -cétophytanate carboxylase (274). En fait, seul le déficit enzymatique de la maladie de Refsum adulte est établi de manière précise. L'oxydation déficiente du phytanate en présence d'une oxydation normale du L- α -hydroxyphytanate met en évidence un bloc métabolique situé au niveau de l' α -hydroxylation du phytanate (274). Une dégradation déficiente de l'acide phytanique s'accompagne d'une élévation du taux plasmatique de cet acide gras à chaîne ramifiée contenant 20 atomes de carbone (270).

1.6.4 Le cholestérol

Le cholestérol (CH) joue un double rôle. C'est un composé essentiel des membranes structurales cellulaires, mais aussi un régulateur de la transcription génique (275), de la dégradation des protéines et de l'activité enzymatique (276). Le CH, les phospholipides (PL) et les protéines sont à la fois les principaux constituants des membranes cellulaires et intracellulaires animales. Le ratio molaire CH/PL se situe normalement entre 0.7 et 0.9 dans les membranes plasmiques des mammifères (277). L'incorporation du CH au cœur des PL membranaires change les propriétés physiques de ces membranes, telles la fluidité et l'homogénéité. Le CH cellulaire est synthétisé en partie par le foie et véhiculé vers les cellules des organes périphériques par les LDL (278). La cellule contribue aussi à sa propre synthèse de CH (279).

Dans les cellules animales, la majorité des lipides neutres sont des produits issus du métabolisme du mévalonate (280). Cette voie métabolique débute par la condensation de l'acétyl-CoA, suivi par la production de mévalonate consécutive à l'action de l'enzyme HMG-CoA réductase (276). On croyait que les premières réactions enzymatiques se produisaient principalement dans le cytosol, et que la

synthèse du dolichol et du CH s'effectuait uniquement dans le réticulum endoplasmique (280). Le PER est aussi responsable de la synthèse de l'HMG-CoA réductase (281). Lorsque l'on met des PER de foie de rat en présence de protéines cytosoliques, ceux-ci sont capables de catalyser la condensation d'unités d'acétyl-CoA et de convertir le mévalonate en CH (85,282).

La protéine SCP-2 est de faible poids moléculaire (14 kDa) et a été proposée comme protéine facilitant la translocation des stérols à travers les membranes de la cellule (283). Cette protéine possède un effet stimulant sur la synthèse du CH, sur son estérification par les microsomes (284) et sur la conversion du CH en prégnénolone par la mitochondrie des cellules stéroïdogéniques (285). On pense aussi qu'elle sert à maintenir le ratio CH/PL des membranes cellulaires (276) comme la protéine de transfert phosphatidylinositol/phosphatidylcholine maintient le ratio intracellulaire (286). Le PER hépatique contient la concentration cellulaire la plus élevée de protéine SCP-2 (282). Elle est aussi présente dans la bordure en brosse de l'intestin. Sa présence exclusive dans le jéjunum lui confère un rôle potentiel dans le métabolisme du CH nouvellement absorbé (287).

On a présumé que le peroxyosome était très important, sinon essentiel, pour la synthèse du cholestérol (288). La protéine mévalonate kinase et son activité sont très réduites chez les patients atteints d'un déficit peroxyosomal (289). Par contre, des cellules de tels patients incubées avec de l' $[^{14}\text{C}]$ -octanoate, $[^{14}\text{C}]$ -acétate, ou du $[^{14}\text{C}]$ -mévalonate produisent des concentrations normales de cholestérol (290). On peut donc douter de la nécessité des PER dans la synthèse du CH.

1.6.5 Les acides biliaires

L'homéostasie du CH chez les mammifères représente une balance délicate entre les voies métaboliques de synthèse et son catabolisme. Dans le foie, organe principal du métabolisme du CH (109), l'approvisionnement est assuré par les récepteurs des LDL (291) et par les précurseurs acétate, responsables de la synthèse *de novo* du CH (292). Même si le CH et ses esters sont essentiellement transportés par les LDL, les HDL sont utilisés dans une moindre mesure. Ils transfèrent le CH

des tissus périphériques vers le foie, qui le catabolise partiellement en AB. Il n'existe qu'une seule voie catabolique pour le CH: sa conversion en acides biliaires hydrophiles qui seront excrétés dans la bile (293).

La synthèse des AB par le foie dépend d'un minimum de 10 enzymes qui doivent opérer une hydroxylation de la molécule du CH, raccourcir et oxyder la chaîne latérale (294). La conversion du CH en AB débute par les transformations sur le noyau de la molécule. Les enzymes impliquées sont principalement situées dans le réticulum endoplasmique et le cytosol. Par la suite, survient la dégradation de la chaîne latérale du stéroïde de 27 carbones en un acide carboxylique (295).

La première étape de conversion du CH en acides biliaires primaires, les acides cholique et chénodéoxycholique est sous la dépendance du réticulum endoplasmique. La deuxième étape dépend entièrement du PER. Les autres réactions semblent être catalysées par les mêmes enzymes impliquées dans la β -oxydation peroxysomiale des AG, c'est-à-dire l'hydratase, la déshydrogénase et la thiolase (296). Deux études ont examiné la stéréospécificité des enzymes participant à la naissance des AB primaires et ont conclu que ces enzymes ne sont pas stéréosélectifs dans leur action (297,298). Lorsqu'un patient est supplémenté en acide ursodéoxycholique, le principal métabolite formé est le Δ^{22} -ursodéoxycholique qui est le produit d'une β -oxydation sur sa chaîne latérale. Cette β -oxydation est spécifique aux acides biliaires ayant un groupement hydroxyl 7β et est dépendante du PER (299). La mitochondrie possède aussi une capacité enzymatique de convertir les formes précurseurs en acides biliaires. Cette capacité est cependant beaucoup plus restreinte que celle du PER (300). Dans les maladies peroxysomiales on note la présence d'acides biliaires anormaux, notamment les acides di- et trihydroxycholestanoïques qui sont très toxiques pour le foie et qui pourraient en partie expliquer l'hépatopathie qui accompagne invariablement la maladie de Zellweger (301).

Les travaux de Kase et Bjorkhem ont démontré que le PER est responsable de la conjugaison des AB à un acide aminé (302). Après une séparation des organites

hépatiques sur un gradient de Nycodenz, seuls les PER et les microsomes ont montré une activité de la CoA:amino-acide-N-acyltransférase des AB (303). L'activité est par contre beaucoup plus importante dans la fraction peroxysomiale et il existe de très grandes différences entre les valeurs du K_m et les concentrations de saturation de la glycine et de la taurine. Dans le foie de rat, l'amidation peroxysomiale du [^{14}C] choloyl-CoA possède un K_m de 0.9×10^{-3} M pour la taurine comparativement à 17×10^{-3} M pour la glycine (303). Les valeurs élevées du K_m de la glycine sont en accord avec le fait que la bile de rat ne contient presque exclusivement que des AB conjugués à la taurine (303). Chez l'homme, le ratio des AB glycoconjugués/tauroconjugués est de 1 et traduit le fait que l'enzyme responsable de la conjugaison a une affinité égale pour les deux acides aminés (172).

1.6.6 Fonction antioxydante

Etant donné que le peroxysome est à la fois le site d'enzymes producteurs d'agents oxydatifs tels les oxydases, le cytochrome P-450, la cytochrome P-450 réductase, la cytochrome B-5 réductase, et le site d'enzymes antioxydants tels la CuZn superoxyde dismutase (SOD) le MnSOD, la glutathion peroxydase et la catalase, il est évident que le PER joue un rôle important dans les mécanismes de défense antioxydants de la cellule (304).

DEUXIÈME PARTIE

CONTRIBUTION ORIGINALE

Etudes pilote

Les appendices 1 et 2 rapportent les résultats d'une étude pilote effectuée chez 17 enfants FKP et 11 témoins. On y note que les acides gras à chaîne très longue sont augmentés et que les plasmalogènes sont diminués dans le sang des patients FKP déficients en AGE. Voulant vérifier l'hypothèse selon laquelle la déficience en AGE est responsable de ces perturbations, trois groupes de rats ont reçu des diètes dont la quantité d'AGE différaient. Pour le groupe de rats témoins 57% des AG étaient polyinsaturés, alors que les diètes des rats restreints et déficients en AGE ne contenaient respectivement que 11% et 3% d'AG polyinsaturés. Les animaux furent sacrifiés après 9 semaines et nous fîmes l'analyse des acides gras par chromatographie gazeuse. L'appendice 3 nous montre les niveaux de déficience en AGE obtenus sur différents tissus. L'appendice 4 fait état des AG à chaîne très longue et d'un marqueur des plasmalogènes dans les phospholipides des homogénats de foie, de cœur et de cerveau. Alors que les AG à chaîne très longue sont augmentés dans les phospholipides du cœur des animaux déficients en AGE, le marqueur des plasmalogènes, le 18:0 DMA/18:0, est diminué dans les phospholipides du foie de ceux-ci. Les phospholipides du cerveau des différents groupes de rats n'ont montré aucune différence.

Hypothèse de travail et but du projet de recherche

De nos études pilote chez les patients FKP et les rats, nous avons fait 3 observations:

1. La déficience en AGE entraîne des signes biochimiques de dysfonction peroxysomiale.
2. Les patients FKP déficients en AGE ont des niveaux de vitamine E plus faibles que ceux qui ne le sont pas.
3. Les patients FKP avec complication hépato-biliaire sont plus à risque d'être déficients en AGE.

C'est à partir de ces conclusions que nous avons formulé l'hypothèse suivante: La déficience en AGE et/ou la peroxydation de ceux-ci peut entraîner une dysfonction peroxysomiale.

Afin de vérifier cette hypothèse la première étude avait pour buts: 1) de documenter la présence de peroxydation lipidique dans un groupe de patients FKP 2) de mesurer le statut des antioxydants exogènes 3) d'étudier l'effet d'un supplément de β -carotène sur la peroxydation lipidique et sur la déficience en AGE.

Ayant montré en 1989 (12) que les patients FKP avec atteinte hépato-biliaire sont plus vulnérables à la déficience en AGE et conscients des effets bénéfiques de l'AUDC sur la fonction hépatique de cette maladie, les buts de notre deuxième étude étaient de: 1) de documenter la relation entre l'atteinte hépato-biliaire et la déficience en AGE 2) d'examiner l'impact de l'amélioration de la fonction hépatique sur le statut des AGE.

La troisième étude avait pour objectif de vérifier chez l'animal la relation entre la déficience en AGE, la peroxydation lipidique et la fonction peroxysomiale.

CHAPITRE 2

**SUPPLEMENTATION WITH CAROTENOIDS CORRECTS
INCREASED LIPID PEROXIDATION IN CHILDREN
WITH CYSTIC FIBROSIS**

Publié dans Am. J. Clin. Nutr. 1996;64:87-93.

**Supplementation with carotenoids corrects increased lipid
peroxidation in children with cystic fibrosis**

**Guy Lepage, Josée Champagne, Nancy Ronco,
André Lamarre, Iris Osberg, Ronald J. Sokol, Claude C. Roy**

From the Gastroenterology and Nutrition and Pneumology Units,
Hôpital Ste-Justine, Université de Montréal, Québec, Canada; the Pediatric CRC
Core Laboratory, University of Colorado Health Sciences Center, Denver; and the
Department of Pediatrics, Section of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, The
Children's Hospital, Denver.

Supported by the Canadian Cystic Fibrosis Foundation and by the Medical Research
Council of Canada and U.S. Public Health Service Grant (RR00069) from the
General Clinical Research Branch, Division of Research Resources, NIH.

ABSTRACT

Evidence of lipid peroxidation previously documented in cystic fibrosis (CF) implies an imbalance between free radical generation and antioxidant defense mechanisms. The aim of the present study was to examine the relationship between plasma concentrations of malondialdehyde, a marker of lipid peroxidation and the exogenous antioxidant line of defense. Malondialdehyde concentrations (90.2 ± 4.7 nmol/L) ($P < 0.001$) were higher in 25 CF children aged 9.6 ± 0.8 y than concentrations (69.1 ± 2.6 nmol/L) observed in 17 children used as control subjects and were not correlated with any marker of disease severity. In contrast with their all-*rac*- α -tocopherol status which was normal as a result of routine supplementation with a 200-mg dose of all-*rac*- α -tocopheryl acetate/d, β -carotene was very low. A 2-mo open trial in which 12 children with CF aged 11.5 ± 0.8 y were given 4.42 mg (122 μ mol) β -carotene three times per day led to normalization of malondialdehyde concentration in all but 1 patient, in conjunction with an increase of plasma β -carotene from 0.08 ± 0.03 to 3.99 ± 0.92 μ mol/L. Their plasma concentrations were inversely correlated ($r = -0.54$, $p = 0.006$) with malondialdehyde when the values measured pre- and post-treatment were pooled. We conclude that β -carotene deficiency contributes to lipid peroxidation in CF and that supplementation may eventually prove to be a useful adjunct for the management of the disease.

Key words: Lipid peroxidation, free radicals, oxidant stress, cystic fibrosis, β -carotene, carotenoids, all-*rac*- α -tocopherol, malondialdehyde, antioxidants.

INTRODUCTION

Increased oxidative damage occurs in many human diseases (1) and is likely to play a role in the pathophysiology of lung injury in patients with cystic fibrosis (CF) in view of the severity of the inflammation which accompanies chronic infection (2). Evidence of lipid peroxidation in CF has been documented by several authors (3-10) and is likely attributable to the imbalance between an increased generation of free radicals and a decreased availability of antioxidant defense mechanisms. Over-production of reduced oxygen molecules could be due in part to increased activation of neutrophils (11) and of the arachidonic acid pathway (12). Moreover, ibuprofen significantly slows the progression of the lung disease in CF patients (13). Analysis of bronchoalveolar lavage fluid has revealed a 1000-fold increase in the number of neutrophils recovered from the lungs compared with subjects (14). It is well established that neutrophils, when activated, are a major source of free radicals (15). In addition to neutrophils, two secretory products of *Pseudomonas aeruginosa*, the most commonly found pathogenic bacterium in CF, are capable of damaging local tissues through the generation of hydroxyl radicals (16). Both endogenous and exogenous antioxidants are deficient in patients with CF. There is evidence of low concentrations of glutathione (8) and of glutathione peroxidase (17). Furthermore, the activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes of CF patients and their parents has been shown to be increased, thereby suggesting increased intracellular oxidative stress (18). Low vitamin E concentrations in plasma have led to the routine administration of all-*rac*- α -tocopherol to compensate for its poor absorbability (19). Furthermore, low concentrations of carotenoids in CF patients have led to the suggestion that supplementation with α -tocopherol be considered (2,7,20-21) in view of its potent antioxidant properties (22).

The purpose of the present study was to examine the relationship between lipid peroxidation and exogenous antioxidant vitamin concentrations and to test the possibility that carotenoids could reduce the extent of lipid peroxidation.

SUBJECTS AND METHODS

Subjects:

Twenty-five children with CF (11 boys and 14 girls) with a mean age of 9.6 y (range: 2.7-20.3 y) regularly followed in the CF clinic of l'Hôpital Ste-Justine were recruited for the first part of the study. Seventeen children with a mean age of 10.4 y (range: 4.1-19.2 y) who had blood work done for conditions other than gastrointestinal, hepatic or nutritional problems were used as control subjects. The patients were maintained on their usual medication and were treated with supplemental pancreatic enzymes. They were all receiving 4000 IU vitamin A/d and 200 mg all-*rac*- α -tocopheryl acetate/d. Seventy-two-hour fecal fat collections were analysed by the method of van de Kamer (23). A fasting blood sample was obtained for analysis of γ -glutamyltransferase, β -carotene, vitamin E, malondialdehyde, and fatty acids. The results of these determinations were then examined in relation to their nutritional and essential fatty acid (EFA) status, fecal fat excretion, and pulmonary function.

For the second part of the study, 12 children with CF (8 boys and 4 girls) with a mean age of 11.5 y (range: 7.0-15.9 y) were enrolled in a 2-mo open study of carotenoid supplementation. The study was undertaken during the months of July and August. A β -carotene preparation purchased from Swiss Herbal Remedies Ltd. (Markham, Ontario) contained 25 000 IU β -carotene/caplet. It was taken after each meal with appropriate pancreatic enzyme supplementation. The HPLC profile of the carotenoids revealed that 49% was β -carotene and that each caplet contained 4.42 mg (122 μ mol) of β -carotene. Fasting blood was obtained for determination of β -carotene, all-*rac*- α -tocopherol, retinol, retinyl palmitate, retinol binding protein (RBP), the fatty acid profile, and malondialdehyde. As in the first part of the study, the results of these determinations were examined in relation to nutritional and EFA status, fecal fat excretion, and pulmonary function.

The study protocol was approved by the Ethics Committee of l'Hôpital Ste-Justine and consent was obtained from the parents.

Plasma samples

Plasma was collected from fasting subjects with EDTA as an anticoagulant. To avoid isomerization of carotenoids, aluminium foil was used to protect all blood samples from light as soon as they were drawn. The plasma specimens were stored in vials at -80°C until analyzed.

Chemicals

Standards of retinol, retinyl acetate, all-*rac*- α -tocopherol, tocopheryl acetate, β -carotene, retinyl palmitate, fatty acids and 1,1,3,3-tetraethoxypropane were purchased from Sigma Chemical Co (St-Louis). HPLC-grade water, methanol, methylene chloride, and acetonitrile were from BDH Inc (Ville St-Laurent, Canada). All solvents used for gas-liquid chromatographic analysis and vitamin extraction were glass-distilled in our laboratory.

Vitamin determinations

At the time of the assay, samples of plasma were thawed in the dark and aliquots were processed for analysis under subdued light; 500 μ L samples of the different specimens were mixed in tubes for 0.5 min in a vortex mixer with 500 μ L of the internal standards (12 μ g each of retinyl acetate and tocopheryl acetate in C₂H₅OH with 125 μ g ascorbic acid). After the addition of *n*-hexane (twice, 2.5 mL each), tubes were shaken for 10 min, sonicated for 3 min, and centrifuged for 5 min at 1000 xg and room temperature. The *n*-hexane layer was transferred into a tube and the pooled organic extracts of each sample were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at 20°C. Tubes were rapidly removed from the water bath and the residue was reconstituted with 150 μ L acetonitrile:methylene chloride:methanol (70:20:10, by vol) to which 25 μ g ascorbic acid in 50 μ L ethanol were added. The

tubes were then vortexed for 0.5 min and sonicated for 3 min. Twenty microliters of this solution were injected into the HPLC system.

The chromatographic analysis was performed on a Hewlett-Packard (Palo Alto, CA) spherical 5- μm C₁₈ octadecylsilane Hypersil column (20 cm X 2.1 mm internal diameter). A guard column of the same package preceded the main column. This reversed-phase ODS column was used for the simultaneous determination of the liposoluble vitamins by using isocratic elution with methanol:acetonitrile (60:40, by vol). The flow-rate was 400 $\mu\text{L}/\text{min}$. The light absorption of the compounds was measured with a photodiode-array detector at wavelengths 282 nm for tocopheryl acetate; 290 nm for all-*rac*- α -tocopherol; 322 nm for retinol, retinyl palmitate and retinyl acetate; and 446 nm for β -carotene. The amounts were calculated by using tocopheryl acetate and retinyl acetate as internal standards. The areas under the curve of the chromatographic peaks were used in the calculations. All manipulations were carried out under subdued light to avoid photoisomerization of the compounds. All analyses were run on a Hewlett-Packard 1090 HPLC. The photodiode-array detector acquires chromatographic signals and spectra over the wavelength range of 190-600 nm.

Malondialdehyde, fatty acid and RBP determinations

Proteins from plasma samples (500 μL) were precipitated as described previously (24) and the supernatant was filtered through a 0.2- μm cellulose acetate syringe filter. After complexing malondialdehyde to thiobarbituric acid (TBA), an aliquot was injected into the HPLC apparatus for separation and measurement at 532 nm of the malondialdehyde-TBA complex (24). The analyses were performed on the Hewlett-Packard 1090 HPLC. Both the precolumn and the column were stainless steel Hypersil' octadecylsilane C₁₈ with a particle size of 5 μm . The precolumn measured 4 x 20 mm, whereas the dimensions of the column were 100 x 4.6 mm. The mobile phase consisted of methanol and water in a gradient mode (23).

Plasma fatty acids were analyzed after direct transesterification as published previously (25) with a Hewlett-Packard 5880 gas chromatograph as described earlier (26). The resulting FA methyl esters were injected into a 60-m fused silica capillary column coated with SP-2331. RBP was determined by rate nephelometry (Beckman Auto-ICS; Beckman, Montréal, Canada) with Beckman reagents and standards.

Statistical analysis

All results are expressed as means \pm SEs. Statistical analyses were performed by using Student's *t* test, analysis of variance, and Spearman correlation coefficient analysis (27). A P value of 0.05 was used as the level of significance.

RESULTS

The clinical characteristics of the 25 children with CF recruited for the first part of the study (survey) as well as for the second part (clinical trial) are shown in **Table 1**. Fasting plasma concentrations of all-*rac*- α -tocopherol and β -carotene in patients who were supplemented with 200 mg of all-*rac*- α -tocopherol and of control subjects are shown in **Figure 1**. Although concentrations of all-*rac*- α -tocopherol did not differ between CF patients (20.7 ± 1.5 $\mu\text{mol/L}$) and control subjects (19.0 ± 0.8 $\mu\text{mol/L}$), fasting plasma values of β -carotene concentrations were much lower in CF patients (85.7 ± 13.3 nmol/L) than in control subjects (372.5 ± 35.7 nmol/L , $P < 0.0001$). When expressed as molar ratios to total plasma fatty acids, the all-*rac*- α -tocopherol (mmol/mol) and β -carotene ($\mu\text{mol/mol}$) values in CF patients were 2.16 ± 0.15 and 9.51 ± 1.65 , respectively. The corresponding values in control subjects were 1.97 ± 0.08 (mmol/mol) and 36.8 ± 4.0 ($\mu\text{mol/mol}$), respectively.

Malondialdehyde concentrations in CF were higher than in control subjects ($P < .001$) and fatty acid profiles differed markedly (**Table 2**). The percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ($P < 0.0001$) as well as the ratio of 20:3n-9 to 20:4n-6 ($P < 0.0001$) revealed that CF patients as a group had evidence of EFA deficiency (EFAD).

The clinical characteristics of the 12 CF children with CF recruited for the open trial with β -carotene are summarized in **Table 1**. In response to (122 μmol) β -carotene three times per day over 2 mo, plasma β -carotene concentrations increased from 0.08 ± 0.03 to 3.99 ± 0.92 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.005$); (**Figure 2**) concentrations above those observed in healthy pediatric control subjects. A wide range in response was observed. Malondialdehyde concentrations decreased from 95.4 ± 13.4 to 56.6 ± 4.8 nmol/L ($P < 0.02$), similar to control concentrations in all but one patient. This teenager was seen for an exacerbation of his pulmonary disease and required antibiotics once the β -carotene supplementation had started. It is interesting that his β -carotene concentration is the lowest point plotted in the left panel of **Figure 2**

eventhough he had been supplemented. As shown in **Figure 3**, plasma malondialdehyde concentrations were inversely related to plasma β -carotene concentrations when the values obtained before and after treatment were plotted together ($r=-0.54$, $p=0.006$).

In view of the possibility that β -carotene supplementation could have contributed to hypervitaminosis A, plasma of retinol, retinyl palmitate and RBP were measured. There was no significant change in retinol or RBP (**Table 3**). Values for RBP were generally low; one-third of the patients had values below the range in normal control subjects (1.4-4.4 $\mu\text{mol/L}$). There was excellent correlation between retinol and RBP plasma concentrations before ($r=0.96$, $P<0.001$) as well as after β -carotene supplementation ($r=0.91$, $P<0.001$). Moreover, the ratio of retinol to RBP significantly increased toward normal with β -carotene supplementation. However, retinyl palmitate represented $4.55\pm 0.70\%$ of total plasma retinol in CF patients, whereas undetectable in control subjects. Furthermore, this fraction of total plasma retinol increased to $7.03\pm 0.86\%$ with β -carotene supplementation ($P<0.008$); however, β -carotene was not associated with a change in all-*rac*- α -tocopherol.

The fatty acid profiles obtained before and after β -carotene supplementation revealed little change in total fatty acids or in the percentage of PUFAs (**Table 4**).

DISCUSSION

This study confirms previous work reporting ongoing lipid peroxidation and low β -carotene concentrations in CF patients (2-9, 15, 16, 20, 21, 28). Elevated plasma concentrations of malondialdehyde, despite normal concentrations of all-*rac*- α -tocopherol, suggests that there is a relation between lipid peroxidation and the β -carotene status of children with CF. In fact, plasma malondialdehyde concentrations were inversely related to plasma β -carotene concentrations when all the values, before and after were pooled. This finding was further substantiated in the second part of the study by the observation that malondialdehyde concentrations decreased in response to β -carotene concentrations.

All patients who were part of this study received a regular supplement of vitamin E (Aquasol E, Rhône-Poulenc Inc., Rorer, Montréal, Canada). Because β -carotene is a lipid soluble provitamin, low concentrations documented previously in CF patients have been explained by malabsorption (29). However, two recent reports suggested that there was a better correlation between β -carotene concentrations and the severity of ongoing inflammation with its attendant generation of free radicals than with the degree of fat malabsorption (2,30). Additionally, carotenoid concentrations correlated negatively with serum immunoglobulin G concentrations, an indirect measure of inflammation (2). The differences in plasma carotenoid concentrations between children with CF and healthy children may be due to rapid turnover of carotenoids, perhaps through quenching of toxic oxygen species generated by chronic inflammation in CF (2).

Malondialdehyde is an important biomarker of lipid peroxidation as an end product of the oxidation and decomposition of PUFAs containing three or more double bonds. It is also an endogenous byproduct of prostaglandin and leukotriene biosynthesis (31). Of the many assays available to measure malondialdehyde, the TBA-reactive substances test is the most popular (32). TBA binds to the aldehyde, malondialdehyde, which accounts for 15% of lipid peroxidation products (33). The

TBA test for malondialdehyde lacks specificity and many refinements have been made to the technique first described by Sinnhuber and Yu (34). The HPLC technique used in this study is highly specific and reproducible because it measures only the malondialdehyde-TBA adduct (24). Malondialdehyde concentrations were significantly higher in CF patients than in control subjects ($P < 0.001$). Furthermore, there was a good inverse correlation ($P < 0.05$) between malondialdehyde and β -carotene in the 12 CF patients before and after supplementation with the antioxidant vitamin ($P < 0.05$).

EFAD is a well known manifestation of CF (35-42). An earlier study by our group found that it was biochemically present in 47% of 163 patients (42). Two major hypotheses have been raised to explain this deficiency, namely fat malabsorption and a mutation-derived metabolic defect of EFAs. We reported previously that steatorrhea in the EFAD group was more than twofold that in the group with a normal EFA status (42). Nevertheless, the possibility of a metabolic defect of EFAs has received some support in view of the failure of most dietary interventions to correct the deficit (35,40,43,44) and indirect evidence of an increased diversion of EFA through the eicosanoid pathway (38). It is also possible that EFAD could be secondary to EFA losses through peroxidation. PUFAs, whether free or incorporated into membrane lipids, are readily attacked by free radicals and are therefore lost. However, the present data do not support this mechanism because there was no correlation between malondialdehyde and the traditional marker of EFAD, the ratio of 20:3n-9 to 20:4n-6 (45). Furthermore, the EFA status did not change during two months of supplementation. However, the patients who had the best response in terms of their malondialdehyde concentration were those with a more significant degree of steatorrhea. Whether a study of longer duration would have improved the EFA status remains to be seen.

β -carotene is a metabolic precursor of vitamin A. Using [^{13}C] β -carotene in a human study, Parker et al (46) reported recently that 64%, 21% and 14% of the absorbed ^{13}C entered the plasma as retinyl esters, retinol and unaltered β -carotene, respectively. Of note are the observations that retinyl esters expressed as retinyl

palmitate were high and increased by > 50% with β -carotene supplementation. Measurement of serum retinyl esters has been recommended as a good marker of hepatic accumulation of vitamin A because a greater prevalence of abnormal liver-function tests was observed in patients with high plasma retinyl ester concentrations (47). However, even if retinyl esters normally represents <3% of total vitamin A (48), the percentage of circulating retinol as retinyl esters was very small compared with the percentage recorded in hypervitaminosis (49).

There are potentially two major sources of oxygen-free radicals in CF: those produced by an underlying primary defect in intracellular oxygen metabolism (50), and those produced by neutrophils in the lung as a consequence of the pulmonary infection associated with the disease (28). Combined antioxidant deficiencies are more common in CF patients with liver disease than in those without (51). Both intracellular and extracellular antioxidant compartments come into contact with free radicals produced by activated neutrophils in the lungs of CF patients (10). Adequate plasma concentrations of all-*rac*- α -tocopherol do not seem to be sufficient to inhibit lipid peroxidation. For a given concentration of plasma or erythrocyte α -tocopherol, erythrocytes of patients with CF were shown to be more susceptible to peroxide-induced hemolysis than were those of control subjects (52).

Carotenoids, β -carotene in particular, have received much attention in the past few years as major exogenous antioxidants. β -carotene prevents peroxidation of PUFAs by singlet oxygen or by radical initiators (53). In carotene-depleted women, production of hexanal, pentanal, and pentane by copper-oxidized plasma low-density lipoproteins was greater than the production of these compounds when they were repleted with β -carotene (54). Erythrocyte superoxide dismutase activity was depressed in carotene-depleted women and it recovered with repletion, suggesting that β -carotene may have acted as a direct scavenger of superoxide radicals. TBA-reactive substances in their plasma were elevated and decreased with repletion (54). Allard et al (55) reported that breath-pentane output was higher in smokers than in nonsmokers and was reduced significantly only in smokers receiving β -carotene.

Furthermore, supplementation seems to improve some indexes of immune response in humans with a previously stressed immune response (56), albeit not in healthy individuals (57). β -carotene has also been shown to inhibit free radical-induced peroxidation in membranes (58) and to have additive effects when given in conjunction with all-*rac*- α -tocopherol (59). Other have produced evidence that both act synergistically (60). A combination of β -carotene and all-*rac*- α -tocopherol results in an inhibition of lipid peroxidation significantly greater than the sum of individual contributions in liver microsomal membranes submitted to free radical attack (61). In CF, β -carotene has been shown to increase the resistance of low-density lipoproteins to oxidation and to decrease plasma malondialdehyde concentrations in CF patients (62). Should our preliminary observations be confirmed by a double-blind trial, CF would constitute one of the first in vivo models in which the essentiality of β -carotene as an antioxidant has been shown.

In conclusion, this study showed that in CF there is an imbalance between oxidative stress and antioxidant defense mechanisms despite an adequate supply of all-*rac*- α -tocopherol. The clinical implications of these findings cannot be underestimated because free radical-mediated damage could play a role in the progressive deterioration of lung function. The observations that malondialdehyde concentrations were inversely correlated with those of β -carotene but reverted to normal in response to supplementation suggests that this antioxidant provitamin is essential in preventing lipid peroxidation. A controlled trial should confirm these findings before β -carotene supplements are advocated for all CF patients.

REFERENCES

1. Halliwell B, Chirico S. *Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr 1993;57 Suppl. 715S-25S.
2. Homnick DN, Cox JH, DeLoof MJ, Ringer TV. *Carotenoid levels in normal children and in children with cystic fibrosis*. J Pediatr 1993;122:703-07.
3. Salh B, Webb K, Guyan PM, et al. *Aberrant free radical activity in cystic fibrosis*. Clin Chim Acta 1989;181:65-74.
4. Richard MJ, Aguilaniu B, Arnaud J, Gout JP, Favier A. *Selenium and oxidant injury in patients with cystic fibrosis*. In: Emerit I, Al, eds. *Antioxidants in therapy and preventive medicine*. New York: Plenum Press, 1990:175-8.
5. Lepage G, Kneepkens CMF, Smith L, et al. *Low beta-carotene may contribute to the accumulation of free radicals in cystic fibrosis (CF)*. FASEB J 1991;5:1075 (Abstr).
6. Bilton D, Maddison J, Webb AK, Seabra L, Jones M, Braganza JM. *Cystic fibrosis, breath pentane, and lipid peroxidation*. The Lancet 1991;337:1420.
7. Winklhofer-Roob BM. *Oxygen free radicals and antioxidants in cystic fibrosis: the concept of an oxidant-antioxidant imbalance*. Acta Paediatr Suppl 1994;395:49-57.
8. Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. *Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis*. J Appl Physiol 1993;75:2419-24.
9. Langley SC, Brown RK, Kelly FJ. *Reduced free-radical-trapping capacity and altered plasma antioxidant status in cystic fibrosis*. Pediatr Res 1993;33:247-50.
10. Brown RK, Kelly FJ. *Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis*. Pediatr Res 1994;36:487-93.

11. Kharazmi A, Rechnitzer C, Schiote PO, Jensen T, Baek L, Hoiby N. *Priming of neutrophils for enhanced oxidative burst by sputum from cystic fibrosis patients with Pseudomonas aeruginosa infection.* Eur J Biochem 1987;17:256-61.
12. 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;46:511-18.
13. Konstan MW, Byard PJ, Hoppel CL, Davis PB. *Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis.* N Engl J Med 1995;332:848-54.
14. Holsclaw DS. *Cystic fibrosis and pulmonary involvement from multiple perspectives.* Semin Respir Infect 1993;7:141-50.
15. Babior BM. *The respiratory burst oxidase.* Trends Biomed Sci 1987;12:241-3.
16. Britigan BE, Roeder TL, Rasmussen GT, Shasby DM, McCormick ML, Cox CD. *Interaction of the Pseudomonas aeruginosa secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells.* J Clin Invest 1992;90:2187-96.
17. Portal BC, Richard MJ, Faure HS, Hadjian AJ, Favier AE. *Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis.* Am J Clin Nutr 1995;61:843-7.
18. Matkovic B, Gyurkovits K, Laszlo A, Szabo L. *Altered peroxide metabolism in erythrocytes from children with cystic fibrosis.* Clin Chim Acta 1982;125:59-62.
19. Sokol RJ, Reardon MC, Accurso FJ, et al. *Fat-soluble-vitamin status during the first year of life in infants with cystic fibrosis identified by screening of newborns.* Am J Clin Nutr 1989;50:1064-71.

20. Ringer TV, DeLoof MJ, Cox JH, Homnick DN. *Carotenoid levels in cystic fibrosis and healthy children*. *Pediatr Res* 1991;29:376 (Abstr).
21. Lepage G, Ronco N, Champagne J, Lamarre A, Roy CC. *Beta-carotene inhibits lipid peroxidation and improves peroxisomal function in cystic fibrosis (CF)*. *FASEB J* 1993;7:39 (Abstr).
22. Krinsky NI. *Actions of carotenoids in biological systems*. *Annu Rev Nutr* 1993;13:561-87.
23. van de Kamer JH, ten Bokkel Huinink H, Weijers HA. *A rapid method for the determination of fat in faeces*. *J Biol Chem* 1949;177:347-55.
24. Lepage G, Munoz G, Champagne J, Roy CC. *Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography*. *Anal Biochem* 1991;197:277-83.
25. Lepage G, Roy CC. *Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction*. *J Lipid Res* 1986;27:114-20.
26. Lepage G, Roy CC. *Specific methylation of plasma nonesterified fatty acids in a one-step reaction*. *J Lipid Res* 1988;29:227-35.
27. Dixon WJ, Massey Jr FJ. *Introduction to statistical analysis*. 3rd ed. Toronto: McGraw-Hill Book Co., 1969.
28. Brown RK, Kelly FJ. *Role of free radicals in the pathogenesis of cystic fibrosis*. *Thorax* 1994;49:738-42.
29. Homnick DN, Spillers CR, Cox SR, et al. *Single- and multiple-dose response relationships of beta-carotene in cystic fibrosis*. *J Pediatr* 1995;127:491-4.
30. Lawrence R, Sorrell T. *Eicosapentaenoic acid in cystic fibrosis: Evidence of a pathogenetic role for leukotriene B₄*. *Lancet* 1993;342:465-69.

31. Wong JW, Ebeler SE, Rivkah-Isseroff R, Schibamoto T. *Analysis of malondialdehyde in biological samples by capillary gas chromatography*. Anal Biochem 1994;220:73-81.
32. Drapper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. *A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials*. Free Radic Biol Med 1993;15:353-63.
33. Kappus H. *Lipid peroxidation: mechanism and biological relevance*. In: Aruoma OI, Halliwell B, eds. Free radicals and food additives. London: Taylor & Francis, 1991;59-75.
34. Sinnhuber RO, Yu TC. *2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products: II. The quantitative determination of malonaldehyde*. Food Tech 1957;12:9-12.
35. 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.
36. Landon C, Kerner JA, Castillo R, Adams L, Whalen R, Lewiston NJ. *Oral correction of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis*. JPEN 1981;5:501-4.
37. Parsons HG, Shillabeer G, Rademaker AW. *Early onset of essential fatty acid deficiency in patients with cystic fibrosis receiving a semisynthetic diet*. J Pediatr 1984;105:958-61.
38. Strandvik B, Bronnegard M, Gilljam H, Carlstedt-Duke J. *Relation between defective regulation of arachidonic acid release and symptoms in cystic fibrosis*. J Gastroenterol 1988;23 (suppl 143):1-4.

39. 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;148:327-9.
40. Strandvik B. *Relation between essential fatty acid metabolism and gastrointestinal symptoms in cystic fibrosis.* Acta Paediatr Scand Suppl 1989;363:58-65.
41. Lloyd-Still JD, Johnson SB, Holman RT. *Essential fatty acid status and fluidity of plasma phospholipids in cystic fibrosis infants.* Am J Clin Nutr 1991;54:1029-35.
42. 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;30:1483-90.
43. 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;63:259-71.
44. Strandvik B, Berg U, Kallner A, Kusoffsky E. *Effect on renal function of essential fatty acid supplementation in cystic fibrosis.* J Pediatr 1989;115:242-50.
45. Holman RT. *The ratio of trienoic:tetraenoic acids in tissue lipids as a measure of essential fatty acid requirement.* J Nutr 1960;70:405-10.
46. Parker RS, Swanson JE, Marmor B, et al. *Study of beta-carotene metabolism in humans using ¹³C-beta-carotene and high precision isotope ratio mass spectrometry.* Ann NY Acad Sci 1993;691:86-95.

47. Krasinski SD, Russell RM, Otradovec CL, et al. *Relationship of vitamin A and vitamin E intake to fasting plasma retinol, retinol-binding protein, retinyl esters, carotene, α -tocopherol and cholesterol among elderly people and young adults: increased plasma retinyl esters among vitamin A-supplement users.* Am J Clin Nutr 1989;49:112-20.
48. Krasinski SD, Cohn JS, Schaefer EJ, Russell RM. *Postprandial plasma retinyl ester response is greater in older subjects compared with younger subjects.* J Clin Invest 1990;85:883-92.
49. Smith FR, Goodman DS. *Vitamin A transport in human vitamin A toxicity.* N Engl J Med 1976;294:805-8.
50. Shapiro BL. *Evidence for a mitochondrial lesion in cystic fibrosis.* Life Sci 1989;44:1327-34.
51. Winklhofer-Roob BM. *Oxygen free radicals and antioxidants in cystic fibrosis: the concept of an oxidant-antioxidant imbalance.* Acta Paediatr Suppl 1994;395:49-57.
52. James DR, Alfaham M, Goodchild MC. *Increased susceptibility to peroxide-induced haemolysis with normal vitamin E concentrations in cystic fibrosis.* Clin Chim Acta 1991;204:279-90.
53. Burton GW, Ingold KU. *Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant.* Science 1989;224:569-73.
54. Dixon ZR, Burri BJ, Clifford A, et al. *Effects of a carotene-deficient diet on measures of oxidative susceptibility and superoxide dismutase activity in adult women.* Free Rad Biol Med 1994;17:537-44.
55. Allard JP, Royall D, Kurian R, Muggli R, Jeejeebhoy KN. *Effects of β -carotene supplementation on lipid peroxidation in humans.* Am J Clin Nutr 1994;59:884-90.

56. Prabhala RH, Garewal HS, Hicks MJ, Sampliner RE, Watson RR. *The effects of 13-Cis-retinoic acid and beta-carotene on cellular immunity in humans.* Cancer 1991;67:1556-60.
57. Daudu PA, Kelley DS, Taylor PC, Burri BJ, Wu MM. *Effect of a low β -carotene diet on the immune functions of adult women.* Am J Clin Nutr 1994;60:969-72.
58. Kennedy TA, Liebler DC. *Peroxy radical scavenging by β -carotene in lipid bilayers: effect of oxygen partial pressure.* J Biol Chem 1992;267:4658-63.
59. Jialal I, Grundy SM. *Effects of dietary supplementation with α -tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein.* J Lipid Res 1992;33:899-906.
60. Leibovitz B, Hu ML, Tappel AL. *Dietary supplements of vitamin E, β -carotene, coenzyme Q10 and selenium protect tissues against lipid peroxidation in rat tissue slices.* J Nutr 1990;120:97-104.
61. Palozza P, Krinsky NI. *β -carotene and alpha-tocopherol are synergistic antioxidants.* Arch Biochem Biophys 1992;297:184-7.
62. Winklhofer-Roob BM, Puhl H, Khoschsorur G, Van't Hof MA, Esterbauer H, Shmerling DH. *Enhanced resistance to oxidation of low density lipoproteins and decreased lipid peroxide formation during β -carotene supplementation in cystic fibrosis.* Free Radic Biol Med 1995;18:849-59.

Figure Legends

- Figure 1** All-*rac*- α -Tocopherol and β -carotene concentrations in 17 control subjects (white bars) and 24 patients with cystic fibrosis (CF) (hatched bars). Plasma β -carotene was barely measurable in CF patients.
- Figure 2** Effect of 4.42 mg (122 μ mol) β -carotene three times per day during a 2-mo open trial in 12 children with cystic fibrosis. Plasma concentrations in 11 of 12 children before supplementation were well below the range ($X \pm 2$ SD, 61 \pm 40 nmol/L) of normal values shown by the shaded box. In response to β -carotene, malondialdehyde concentrations, which were initially higher, fell within the range (53 \pm 13 nmol/L) of normal values shown by the shaded box.
- Figure 3** Relation between plasma β -carotene and plasma malondialdehyde concentrations before and after β -carotene supplementation (Spearman correlation coefficient $r = -0.54$, $P = 0.006$). Circles correspond to patient values before β -carotene supplementation; triangles to patient values after supplementation. (Note break in the horizontal axis).

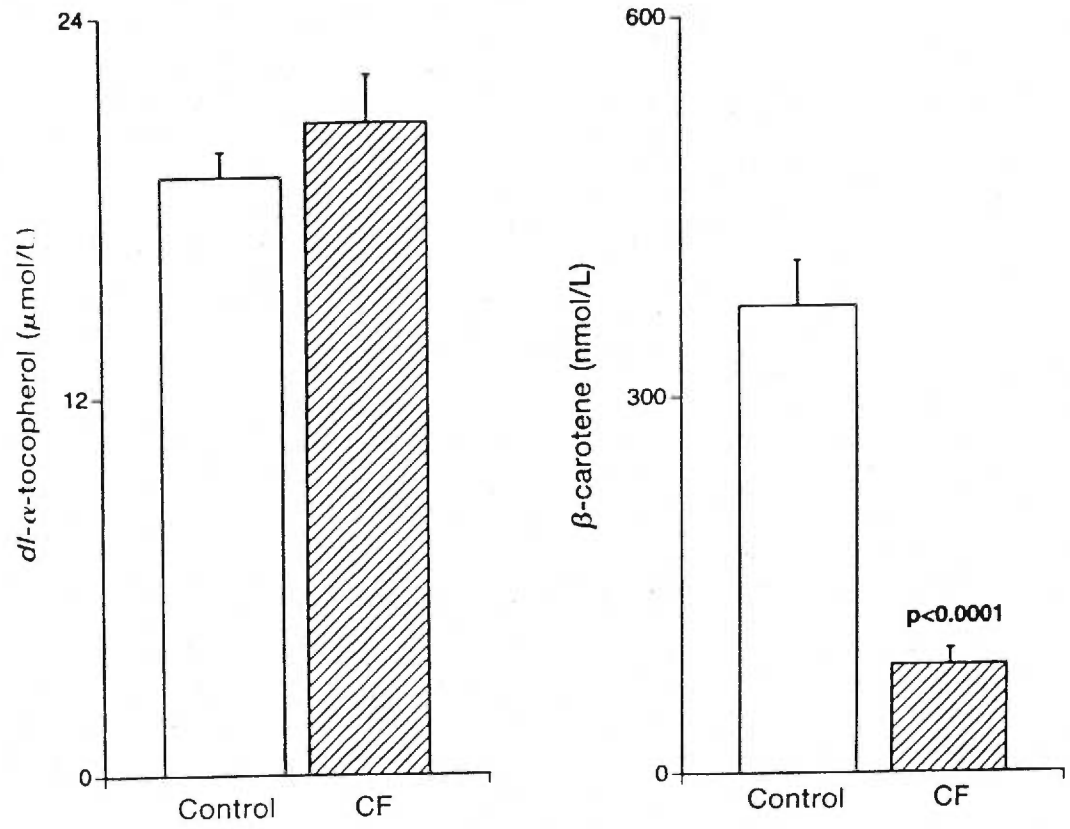


Figure 1

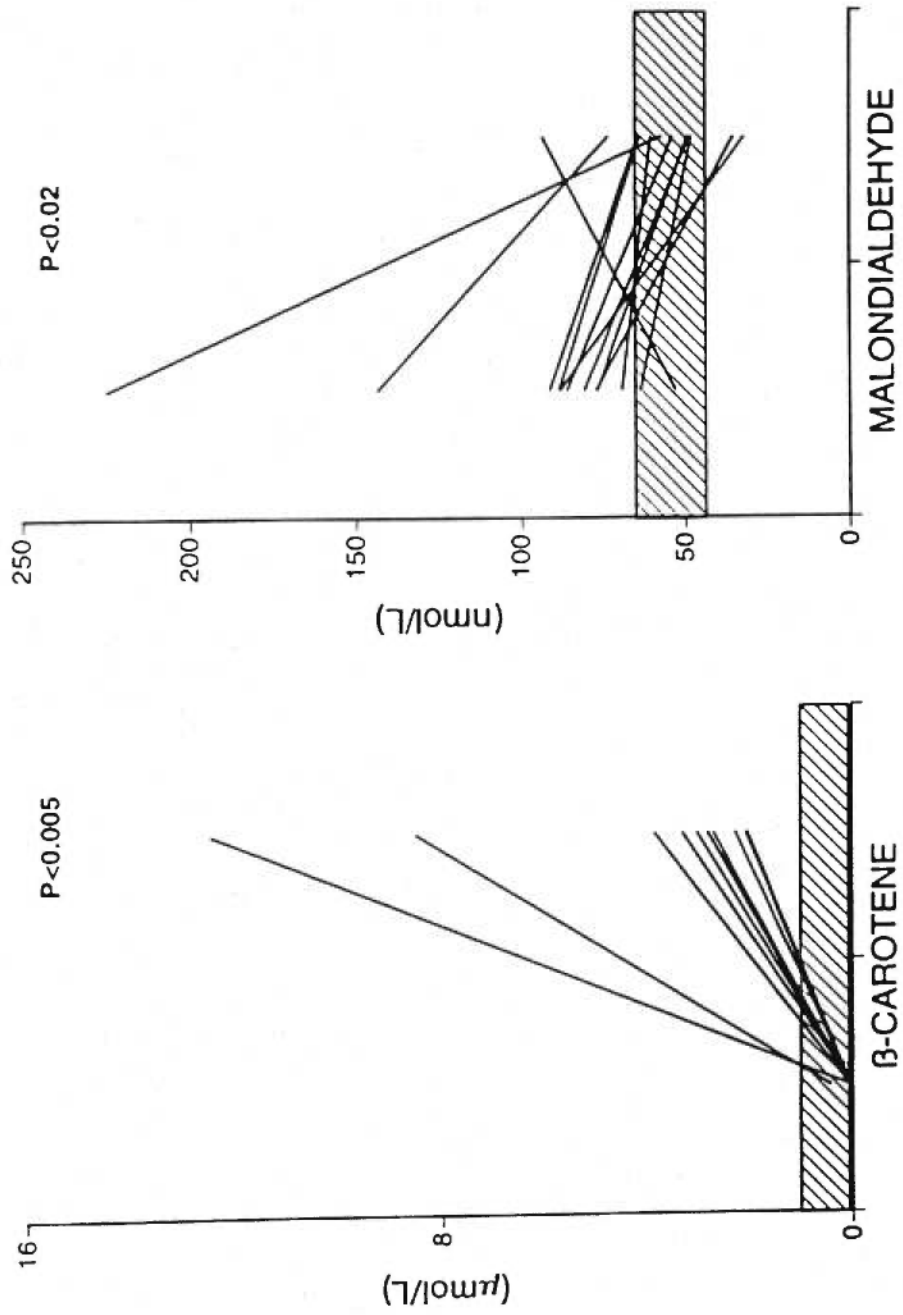


Figure 2

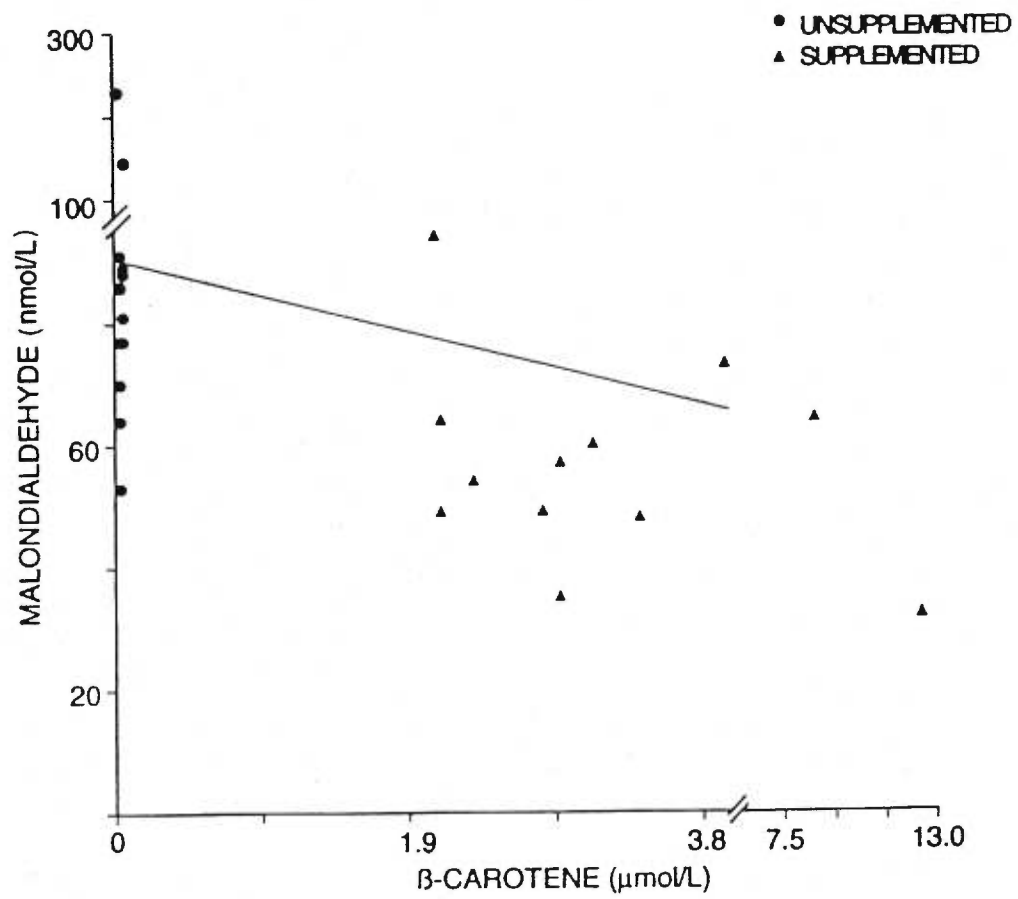


Figure 3

TABLE 1
CF PATIENT CHARACTERISTICS¹

| | SURVEY (n=25) | CLINICAL TRIAL (n=12) | NORMAL RANGE |
|--------------------------------|------------------|--------------------------|-----------------|
| Age (Y) | 9.6±0.8 | 11.5±0.8 | — |
| Weight ² | 96.2±4.8 | 87.9±5.7 | 85-115 |
| Height ² | 98.7±3.7 | 88.8±4.2 | 85-115 |
| Weight for height ² | 97.7±3.5 | 99.1±4.3 | 85-115 |
| Fecal fat (g/d) | 24.8±3.0 | 13.9±3.7 | <5 |
| γGT (IU/L) | 15.8±3.6 | 11.0±1.4 | <30 |
| FVC (%) | 96.7±3.4 | 104.7±5.5 | 80-120 |
| FEV ₁ (%) | 91.0±4.4 | 97.4±4.8 | 85-100 |

¹ X±SEM. γGT, γ-glutamyl transpeptidase; FVC, forced vital capacity, predicted (%); FEV₁, forced expiratory volume at 1 second, predicted (%).

² % expected.

TABLE 2Plasma malondialdehyde and fatty acid profiles ¹

| | Normal range | Controls (n=16) | CF (n=25) | P |
|-----------------------|--------------|--------------------|--------------|--------|
| Malondialdehyde | <80 nmol/L | 69.1±2.6 | 90.2±4.7 | 0.001 |
| Total FA ² | 8-14 mmol/L | 9.80±0.15 | 9.72±0.50 | 0.91 |
| PUFA ³ | 40-46% | 42.97±0.77 | 32.13±0.76 | 0.0001 |
| 20:3n-9/20:4n-6 | 0.01-0.04 | 0.017±0.001 | 0.053±0.006 | 0.001 |

¹ X±SEM² Fatty acid³ Polyunsaturated fatty acids as % of total

TABLE 3

Effects of β -carotene supplementation on plasma β -carotene, RBP, retinol and tocopherol¹

| | NORMAL RANGE | UNSUPPLE- MENTED | SUPPLE- MENTED | P |
|----------------------|---------------------------|---------------------|-------------------|-------|
| β -carotene | 2.0-2.8 $\mu\text{mol/L}$ | 0.08 \pm 0.03 | 3.99 \pm 0.92 | 0.001 |
| RBP | 1.4-3.8 $\mu\text{mol/L}$ | 1.52 \pm 0.15 | 1.42 \pm 0.14 | 0.59 |
| RETINOL | 0.7-2.8 $\mu\text{mol/L}$ | 1.07 \pm 0.07 | 1.10 \pm 0.08 | 0.08 |
| RETINOL:RBP | 0.8-0.9 | 0.72 \pm 0.02 | 0.79 \pm 0.03 | 0.007 |
| RETINYL PALMITATE | <87nmol/L | 50.9 \pm 8.9 | 77.7 \pm 6.5 | 0.004 |
| | <3% ² | 4.55 \pm 0.70 | 7.03 \pm 0.86 | 0.008 |
| α -TOCOPHEROL | 12-28 $\mu\text{mol/L}$ | 17.2 \pm 1.4 | 18.3 \pm 1.7 | 0.16 |

¹ X \pm SEM; n=12

² % of total retinol circulating as retinyl palmitate

TABLE 4Effect of β -carotene supplementation on plasma fatty acid profiles¹

| | NORMAL RANGE | UNSUPPLE- MENTED | SUPPLEMENTED |
|-----------------------|--------------|---------------------|--------------|
| TOTAL FA ² | 8-14 mmol/L | 9.99±0.55 | 9.72±0.28 |
| PUFA ³ | 40-46% | 37.13±1.53 | 36.06±1.65 |
| 20:3n-9/20:4n-6 (%) | 1.0-3.5 | 3.7±0.5 | 3.5±0.6 |

¹ X±SEM; n=12² Fatty acids³ Polyunsaturated fatty acids

CHAPITRE 3

**URSODEOXYCHOLIC ACID IMPROVES THE HEPATIC
METABOLISM OF ESSENTIAL FATTY ACIDS AND RETINOL
IN CHILDREN WITH CYSTIC FIBROSIS**

Publié dans J. Pediatr. 1997;130:52-58.

**URSODEOXYCHOLIC ACID IMPROVES THE HEPATIC METABOLISM
OF ESSENTIAL FATTY ACIDS AND RETINOL IN CHILDREN WITH
CYSTIC FIBROSIS**

**Guy Lepage, MSc, Khazal Paradis, MD, Florence Lacaille MD,
Lyne Sénéchal MD, Nancy Ronco RT, Josée Champagne RT,
Catherine Lenaerts MD, Claude C. Roy MD and Andrée Rasquin-Weber MD**

From the Gastroenterology and Nutrition Service, Department of Pediatrics,
Hôpital Ste-Justine, Université de Montréal, Québec, Canada

Supported by a University-Industry (Jouveinal Inc.) award (UI-0062), from the
Medical Research Council of Canada and by a grant from the Canadian Cystic
Fibrosis Foundation.

ABSTRACT

Objective: Several clinical trials of ursodeoxycholic acid (UDCA) have shown improvement of liver-function test results in cystic fibrosis (CF) with liver disease, however, there is as no evidence that the long-term course will be affected. In view of the observations that UDCA can change the lipid profile and that patients with CF and liver disease are more likely to have essential fatty acid (EFA) deficiency, we elected to examine changes in the lipid profile and in the status of fat-soluble vitamins in response to UDCA.

Patients: Nineteen children with CF and liver dysfunction were recruited for a double-blind, crossover study of 1 year's duration, followed by treatment of the entire group. UDCA was administered at a dosage of 15 mg/kg per day, which, in the absence of a 50% decrease of alanine transaminase or aspartate transaminase or both within 2 months, was increased to 30 mg/kg per day.

Results: At entry, all patients had biochemical evidence of EFA deficiency. The lipid profiles during an average period of 25 months of follow-up showed a significant decrease in triglycerides ($P<0.002$), cholesterol ($P<0.02$) and total fatty acids ($P<0.006$). In addition, UDCA therapy led to an improvement in EFA status, as indicated by an increase ($P<0.05$) in the n-6 fatty acid concentration and a reduction ($P<0.04$) in the ratio 20:3n-9 to 20:4n-6. Although no change in vitamin E concentration was observed, retinol metabolism was altered. There was an increase ($P<0.02$) in the unesterified retinol/retinol binding protein RBP molar ratio in the absence of a difference in retinol binding protein concentration. Furthermore, retinyl esters, which normally account for less than 3% of circulating retinol, decreased ($P<0.05$) from $13.7\% \pm 3.6\%$ to $8.1\% \pm 1.7\%$.

Conclusions: This study shows that UDCA improves the EFA and retinol status of patients with CF and liver disease.

ABBREVIATIONS

| | |
|------|----------------------------------|
| ALT | Alanine transaminase |
| AST | Aspartate transaminase |
| CF | Cystic fibrosis |
| EFA | Essential fatty acid |
| FA | Fatty acid |
| GGT | γ -Glutamyltranspeptidase |
| RBP | Retinol-binding protein |
| UDCA | Ursodeoxycholic acid |

INTRODUCTION

We previously showed that a high percentage (47%) of children with cystic fibrosis have biochemical evidence of essential fatty acid deficiency (1). As constituents of cell membranes, EFAs have profound effects on membrane fluidity and function (2). In addition, there is evidence that EFA deficiency may have an impact on the clinical status of patients with CF through altered eicosanoid production (3,4) and immune function, both of which could affect the progression of pulmonary disease (5). EFA deficiency also has been closely correlated with the presence of fatty liver, a common finding in patients with CF (6). Despite the relatively deleterious effects of EFA deficiency, the mechanism by which it occurs remains hypothetical, and no treatment has been shown consistently to correct the deficiency (7).

Ursodeoxycholic acid has been found to improve liver-test profiles in numerous cholestatic disorders including primary biliary cirrhosis (8,9) and sclerosing cholangitis (10). It has been used also for the dissolution of gallstones (11). UDCA is postulated to exert several beneficial effects: (1) UDCA has a "choleric" effect by increasing bile acid-dependent bile flow, (2) UDCA has a "hepatoprotective" effect by replacing the more hydrophobic and potentially toxic bile acids (12,13); and (3) UDCA is reported to have a beneficial immunomodulatory effect (14). Thus patients with CF and liver disease would potentially benefit from the use of UDCA. Several clinical trials with UDCA in this population have shown improved liver function tests (15-18), as well as increased biliary excretion documented by nuclear medicine liver scans (19). In a study of patients with primary biliary cirrhosis treated with UDCA, a significant decrease in cholesterol concentration was observed (20). In young children with biliary atresia, UDCA has

led to an increase in the concentration of linoleic acid (21). In view of our observations that patients with CF and liver disease are more likely to have EFA and fat-soluble vitamin deficiencies (22), we elected to examine changes in the lipid profile and in the status of fat-soluble vitamins in response to UDCA.

METHODS

Subjects: Nineteen patients with CF (13 boys and 6 girls) aged 7 to 17 years (11.9 ± 0.6 y) entered a 1-year (two periods of 6 months) double-blind, placebo-controlled, cross-over study of UDCA (Ursofalk) therapy. They were randomly assigned to receive either placebo or UDCA which was administered at a dosage of 15 mg/kg per day. In the absence of a 50% decrease of alanine transaminase or aspartate transaminase or both within 2 months, the dose was increased to 30 mg/kg per day. Entry criteria for liver dysfunction consisted of abnormal findings on at least two liver function tests (ALT, AST, γ -glutamyltranspeptidase) and an abnormal finding on an abdominal ultrasound examination or liver biopsy or both. After the cross-over study was completed, patients taking UDCA were allowed to continue to take it, whereas patients taking placebo were then allowed to receive UDCA. One patient died, four moved away and one discontinued his medication. The liver enzyme profile, the lipid profile, and fat-soluble vitamin status were assessed. Total cholesterol, triglycerides, fatty acids, retinol-binding protein, transthyretin, retinol, retinyl esters, α -tocopherol and β -carotene were measured in all patients at the end of the period with placebo and with UDCA. Thereafter, in 13 patients, the tests were repeated after a mean period of 25 ± 2 months (16 to 39 months) of continuous therapy with UDCA. A control group of 17 children aged 5 to 18 years who had blood work done in the context of EFA and lipid-soluble vitamin evaluation was used for normal values. They had no gastrointestinal, hepatic, or nutritional problems.

The patients received their usual medication including pancreatic enzyme supplements. Daily, all received 4000 IU of vitamin A and 200 IU of α -tocopherol. These patients were regularly followed in the CF clinic of l'Hôpital Ste-Justine.

Plasma samples were obtained from 19 age-matched control subjects to determine the normal range of values reported in this study. The study protocol was approved by the ethics committee of l'Hôpital Ste-Justine, and consent was obtained from the parents of all patients.

Plasma samples: Plasma was collected from fasting subjects with ethylenediaminetetraacetic acid as an anticoagulant and placed on ice. To avoid isomerization of carotenoids, we used aluminium foil to protect all blood samples from light as soon as they were drawn. The plasma specimens were stored in vials at -80°C until analysis.

Chemicals: Standards of retinol, α -tocopherol, tocopheryl acetate, β -carotene, retinyl palmitate and FA were purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louis, Mo). High-pressure liquid chromatography-grade water, methanol, methylene chloride, and acetonitrile were from BDH Inc (Ville St-Laurent, Québec, Canada). All solvents used for gas-liquid chromatography analysis and vitamin extraction were glass distilled in our laboratory.

Vitamin determinations: At the time of the assays, samples of plasma were thawed in the dark, and aliquots were processed for analysis under subdued light. Samples of 500 μl of the different specimens were mixed in tubes for 30 seconds on a vortex mixer with 500 μl internal standard (12 μg of tocopheryl acetate in $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ with 125 μg ascorbic acid). After the addition of *n*-hexane (twice, 2.5 ml each), tubes were shaken for 10 minutes, sonicated for 3 minutes, and centrifuged for 5 minutes at 1000 *g*. The *n*-hexane layer was transferred into a tube, and the pooled organic extracts of each sample were evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at 20°C . Tubes were rapidly removed from the water bath, the residue was reconstituted with 150 μl acetonitrile:methylene chloride:methanol (70:20:10, by

volume), to which 25 µg ascorbic acid in 50 µl ethanol was added, and tubes were placed in a vortex mixer for 30 seconds and sonicated for 3 minutes. Of this solution, 20 µl was injected into the high-pressure liquid chromatography system.

The chromatographic analysis was performed on a Hewlett-Packard spherical 5 µm C₁₈ ODS Hypersil column (20 cm X 2.1 mm ID). A guard column of the same package preceded the main column. This reversed-phase ODS column was used for the simultaneous determination of the fatsoluble vitamins by using isocratic elution with acetonitrile:chloroform:isopropanol:H₂O (78:16:3.5:2.5, by volume). The flow-rate was 300 µl/min. The light absorption of the compounds was measured with a photodiode-array detector at wavelengths 282 nm for tocopheryl acetate, 290 nm for α-tocopherol, 322 nm for retinol and retinyl palmitate and 446 nm for β-carotene. The amounts were calculated by using tocopheryl acetate as the internal standard. The areas under the curve of the chromatographic peaks were used in the calculations. All manipulations were carried out under subdued light to avoid photoisomerization of the compounds. All the analyses were run on a Hewlett-Packard 1090 high-pressure liquid chromatograph. The photodiode-array detector acquires chromatographic signals and spectra over the wavelength range of 190 to 600 nm.

Lipid analyses: Plasma FA analysis by gas-liquid chromatography was performed after direct transesterification, as previously published (23), except that benzene was replaced by hexane, which is as efficient and less toxic. The resulting FA methyl esters were injected into a 60 m fused-silica capillary column coated with SP-2331. Analysis was performed on a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph as described previously (24). EFA deficiency was defined as a 20:3n-9 to 20:4n-6% higher than 5% (control, mean ± 8 SD). The total cholesterol and triglyceride concentrations were measured with enzymatic tests from Boehringer Mannheim.

Biochemical analyses: Retinol binding protein and transthyretin were determined by rate nephelometry by using reagents and standards supplied by Hoechst-Roussel Canada, Inc. (Montréal, Québec, Canada).

Statistics: All results are expressed as mean \pm SEM. Differences between the placebo- and UDCA-supplemented groups at 6 and 25 months were assessed by repeated-measures analysis of variance and by paired *t*-test. A P value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

In the study population composed of 13 boys and 6 girls, aged 7 to 17 years (11.9 ± 0.6 y), weight was appropriate for height except in 4 patients (Table 1). Cirrhosis was suspected in 12 patients because of the presence of a nodular or hard liver, splenomegaly, the presence of indicators of portal hypertension on Doppler ultrasonography, or a combination of these. However, as previously reported (25), some liver biopsies were inconclusive: patients with normal clinical examination were found to have biliary cirrhosis on biopsy, whereas minimal biopsy changes were seen in others with a hard liver and clinical evidence of portal hypertension. No side effects were reported during administration of UDCA for up to 39 months.

Liver test results, before UDCA treatment, are shown in Table 1. There was a significant improvement in serum AST, ALT, or γ GT after either 6 or 25 months of treatment (Table 2). In contrast to the ALT and γ GT concentrations, which were significantly lower after 6 and 25 months of UDCA treatment, the decrease in AST differed from the placebo period only at 25 months. However, AST concentration was still abnormal in six cases, whereas ALT and γ GT concentrations were abnormal in eight and four cases, respectively.

As shown in Table 3, the mean total serum FA concentrations decreased after 6 and 25 months of UDCA treatment. The total plasma FA-reducing effect of UDCA was correlated with the magnitude of initial plasma FA levels ($r=0.80$; $P=0.001$) and also with the change in serum AST concentration ($r=0.64$; $P=0.01$). UDCA also led to a decrease in triglyceride and cholesterol concentrations after both periods of treatment. There was a good correlation between the change in total cholesterol values and the change in values for AST ($r=0.71$; $P=0.006$), ALT ($r=0.61$; $P=0.02$) and γ GT ($r=0.67$; $P=0.01$).

Table 4 summarizes the effects of UDCA on plasma FA patterns. There was an increase of linoleic acid (18:2 n -6) after 6 and 12 months of treatment. There also was an increase of arachidonic acid (20:4 n -6) but it became apparent only after 25 months of therapy. Because there was no significant change in 20:3 n -9, the decrease in the marker of EFA deficiency (20:3 n -9/20:4 n -6) at 25 months was primarily the result of an increase in 20:4 n -6. Saturated FAs also were decreased by the treatment. No correlation was found between the degree of EFA deficiency, and either the severity of the underlying liver disease or the amount of lung disease.

The effects of UDCA on plasma RBP and transthyretin concentrations are summarized in **Table 5**. A statistically significant decrease in transthyretin concentrations was noted at 6 and 25 months. In contrast, there was no change in retinol concentration, thereby giving rise to an increase in the unesterified retinol/RBP molar ratio at 25 months. Retinyl palmitate, which normally accounts for less than 3% of circulating retinol, decreased from 13.7% \pm 3.6% to 8.1% \pm 1.7% at the end of treatment. Retinol concentration was strongly correlated with prealbumin levels ($r=0.89$; $P<0.0001$) and not with RBP during the placebo period. However the correlation of retinol with both prealbumin ($r=0.90$; $P<0.0001$) and RBP ($r=0.98$, $p<0.0001$) was very close at the end of the treatment. Of further interest was the strong positive correlation between retinyl esters percentage and AST values during the placebo period ($r=0.88$; $P<0.0001$).

α -tocopherol and β -carotene concentrations were 14.5 \pm 2.0 μ mol/L and 31.2 \pm 7.5 nmol/L, respectively, during the placebo period. No differences were noted after 6 months (13.0 \pm 2.1 μ mol/L, 24.8 \pm 4.8 nmol/L) and after 25 months (16.0 \pm 2.2 μ mol/L, 30.1 \pm 8.0 nmol/L) of UDCA therapy.

DISCUSSION

The data show that, regardless of the severity of liver disease, liver function tests improved with UDCA therapy. In addition, they suggest that the status of EFAs and of retinol is ameliorated.

In children with CF and liver dysfunction who received long-term UDCA therapy, we found a substantial decrease in the total cholesterol concentration, a finding previously reported in patients with primary biliary cirrhosis (26,27) and in healthy subjects (28). We also found a marked decrease in triglyceride concentration, thereby confirming a finding previously documented in an open study of UDCA in children with CF (16). The cholesterol- and triglyceride-reducing effect of UDCA is likely caused by an alteration of the metabolism of cholesterol and triglycerides. UDCA could have altered the concentration of plasma cholesterol by decreasing its synthesis or its absorption from the gastrointestinal tract, by increasing its hepatic extraction from the plasma or by increasing conversion to bile acids. After administration of UDCA for 1 year, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity was reported to decrease threefold (29). UDCA also is known to reduce biliary cholesterol secretion (29). The considerable increase in fecal excretion of cholesterol observed during UDCA treatment was attributable to impairment of cholesterol absorption at the level of the ileum (30). UDCA may augment hepatic extraction of plasma cholesterol through its effect on low-density lipoprotein receptors because this drug has been shown to increase receptor-dependent uptake of low-density lipoprotein in isolated hamster hepatocytes (31) and in patients treated for gallstones (32). It is unclear whether UDCA increases the conversion of cholesterol to bile acids because studies have given conflicting results, with the total

bile acid pool during UDCA therapy found to be enlarged, unchanged, or reduced (30,33-34).

Malnutrition and failure to thrive, two common and severe manifestations of CF, are closely related to survival (35). Although clinical evidence of EFA deficiency has rarely been described, we previously reported that 47% of children with CF have biochemical evidence of EFA deficiency (1) and that those with liver disease are more likely to exhibit EFA deficiency (22). It is not yet known whether EFA deficiency is the result of malabsorption of fat, inadequate caloric intake leading to the oxidation of EFA for energy needs, or an abnormal metabolism of EFA characterized by the release of EFA from membranes. However, the largely unsuccessful efforts at correcting EFA deficiency argue in favor of abnormal metabolism of EFAs (7). Our findings intimate that UDCA may partly correct this defect.

In our study, UDCA therapy led to an increase in plasma *n*-6 fatty acids and to a reduction of the classic EFA-deficiency index, an increase in the ratio of 20:3*n*-9 to 20:4*n*-6. This suggests that UDCA modifies cholesterol and triglyceride homeostasis and also the metabolism of EFA. *In vitro*, studies of the microsomal desaturation-elongation enzymes provide strong evidence that the activities of the Δ -6-desaturase converting 18:2*n*-6 to 18:3*n*-6 and the Δ -5 desaturase converting 20:3*n*-6 to 20:4*n*-6, are both decreased in rats with fatty liver (36). This is consistent with the protection afforded by 18:3*n*-6 (37) and 20:4*n*-6 (38) against the induction of fatty liver in rats. It remains to be seen whether UDCA increases directly the microsomal desaturation-elongation enzyme activity or whether the changes observed in EFA metabolism are the result of the decrease in cytolysis documented by improvement of transaminases.

Patients with CF who are not given supplements of fat-soluble vitamins rarely develop deficiencies of vitamins D or K or both, but close to 50% have biochemical evidence of vitamin A and E deficiencies (39). Intestinal absorption of retinol, which has many similarities to that of triglycerides, has been used as a screening test for lipid malabsorption in patients with CF (40). It is ingested mainly as retinyl esters and as the provitamin, β -carotene. The former are hydrolysed in the gut lumen and absorbed as free retinol, whereas β -carotene is absorbed as such and converted to retinol within the intestinal mucosa (41). Most of the absorbed retinol enters the lymphatic circulation as retinyl esters in chylomicrons. Through the action of lipoprotein lipase, chylomicron remnants are formed (42). Their constituents, including retinyl esters are then taken up by low-density lipoprotein receptors and transferred to hepatocytes (43). The reduction of retinyl esters coincident with a decrease in triglyceride concentrations suggests that UDCA increased the hepatic clearance of chylomicron remnants.

Normally, serum concentrations of vitamin A and RBP reflect the state of liver stores. However, some patients with CF have low RBP and serum retinol concentrations despite increased hepatic concentrations of vitamin A (44). This suggests that the release of vitamin A from liver stores may be defective (45). It is known that in vitamin A-supplemented patients with CF, the hepatic vitamin A reserve is nearly 3.5-fold higher than in healthy control subjects (44). The patients with CF recruited for this study had low circulating levels of retinol despite a daily supplement of vitamin A for years. As in the study of Smith et al (46), we demonstrated that the depressed vitamin A concentrations correlated well with the decreased plasma concentrations of the plasma transport proteins, RBP and transthyretin. Surprisingly, fasting plasma retinyl ester concentrations were considerably increased, albeit not to the extent seen in hypervitaminosis A (47).

Before treatment, the percentage of retinol circulating in the ester form strongly correlated with AST activity, but not after UDCA therapy. This was associated with a 48.8% reduction of retinyl esters, suggesting that the improvement in liver function could have contributed to the reduction of the retinyl ester fraction. These findings suggest that circulating concentration of RBP, retinol and retinyl esters should be closely monitored in children with CF receiving supplements of vitamin A, in view of its hepatotoxicity (48).

In summary, this study confirms that UDCA administration in patients with CF and liver disease leads to a reduction in liver enzymes. It shows that UDCA decreased plasma triglyceride and cholesterol concentrations after 6 and 25 months of treatment. More important, it had a beneficial effect on EFA deficiency by improving the EFA status of the *n*-6 family. Furthermore, UDCA reduced the percentage of total retinol circulating as retinyl esters while increasing the unesterified retinol to RBP molar ratio. In view of these findings, this study suggests that the perturbations documented in the metabolism of lipids, EFAs, retinol and liver dysfunction may be interrelated. The mechanisms by which UDCA alters lipid, EFA, and retinol metabolism may be multifactorial and are not understood, but this understanding may have considerable clinical implications.

REFERENCES

1. Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L, Galéano N, Roy CC. *Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis*. J Lipid Res 1989;30:1483-90.
2. Spector AA, Yorek MA. *Membrane lipid composition and cellular function*. J Lipid Res 1985;26:1015-35.
3. Marcus AJ. *The eicosanoids in biology and medicine*. J Lipid Res 1984;25:1511-6.
4. Mischler EH, Parrell SW, Farrell PM, Raynor WJ, Lemen RJ. *Correction of linoleic acid deficiency in cystic fibrosis*. Pediatric Research 1986;20:36-41.
5. Gibson RA, Teubner JK, Haines K, Cooper DM, Davidson GP. *Relationships between pulmonary function and plasma fatty acid levels in cystic fibrosis patients*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1986;5:408-15.
6. Hulcrantz R, Mengarelli S, Strandvik B. *Morphological finding in the liver of children with cystic fibrosis: a light and electron microscopical study*. Hepatology 1986;6:881-9.
7. 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;63:259-71.
8. Poupon RE, Poupon R, Balkau B. *Ursodiol for the long-term treatment of primary biliary cirrhosis*. N Engl J Med 1994;330:1343-7.

9. Vuoristo M, Färkkilä M, Karvonen A-L, Leino R, Lehtola J, Mäkinen J, Mattila J, Friman C, Seppälä K, Tuominen J, Miettinen TA. *A placebo-controlled trial of primary biliary cirrhosis treatment with colchicine and ursodeoxycholic acid.* Gastroenterology 1995;108:1470-8.
10. Lo SK, Fleming KÆ, Chapman RW. *A 2-year follow-up study of anti-neutrophil antibody in primary sclerosing cholangitis: Relationship to clinical activity, liver biochemistry and ursodeoxycholic acid treatment.* J Hepatol 1994;21:974-8.
11. Fromm H. *Gallstone dissolution therapy. Current status and future prospects.* Gastroenterology 1986;91:1560-7.
12. Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R, O'Brien K. *Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes.* Hepatology 1993;17:869-81.
13. Crosignani A, Podda M, Battezzati PM, et al. *Changes in bile acid composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic acid administration.* Hepatology 1991;14:1000-7.
14. Lacaille F, Paradis K. *The immunosuppressive effect of ursodeoxycholic acid: a comparative in vitro study on human peripheral blood mononuclear cells.* Hepatology 1993;18:165-72.
15. Colombo C, Setchell KDR, Podda M, et al. *Effects of ursodeoxycholic acid therapy for liver disease associated with cystic fibrosis.* J Pediatr 1990;117:482-9.

16. Cotting J, Lentze MJ, Reichen J. *Effects of ursodeoxycholic acid treatment on nutrition and liver function in patients with cystic fibrosis and longstanding cholestasis.* Gut 1990;31:918-21.
17. Galabert C, Montet JC, Lengrand D, Lecuire A, Sotta C, Figarella C, Chazalotte JP. *Effects of ursodeoxycholic acid on liver function in patients with cystic fibrosis and chronic cholestasis.* J Pediatr 1992;121:138-41.
18. Colombo C, Crosignani A, Assaisso M, Battezzati PM, Podda M, Giunta A, Zimmer-Nechemias L, Setchell KDR. *Ursodeoxycholic acid therapy in cystic fibrosis-associated liver disease: a dose-response study.* Hepatology 1992;16:924-30.
19. Roda E, Cipolla A, Salzetta A, et al. *Influence of ursodeoxycholic acid on biliary lipids.* Scand J Gastroenterol 1994;29(Suppl)204:16-8.
20. Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Walker V, Bailey RJ, Blendis LM, Ghent CN, Michieletti P, Minuk GY, Pappas SC, Scully LJ, Steinbrecher UP, Sutherland LR, Williams CN, Witt-Sullivan H, Worobetz LJ, Milner RA, Wanless IR. *The canadian multicenter double-blind randomized controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis.* Hepatology 1994;19:1149-56.
21. Yamashiro Y, Ohtsuka Y, Shimizu T, et al. *Effects of ursodeoxycholic acid treatment on essential fatty acid deficiency in patients with biliary atresia.* J Pediatr Surg 1994;29:425-8.
22. Levy E, Lepage G, Bendayan M, et al. *Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients.* J Lipid Res 1989;30:1197-1209.

23. Lepage G, Roy CC. *Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction.* J Lipid Res 1986;27:114-20.
24. Lepage G, Roy CC. *Specific methylation of plasma nonesterified fatty acids in a one-step reaction.* J Lipid Res 1988;29:227-35.
25. Roy CC, Weber AM, Morin CL, et al. *Hepatobiliary disease in cystic fibrosis: A survey of current issues and concepts.* J Peds Gastr Nutr 1982;4(1):469-78.
26. Balan V, Dickson ER, Jorgensen RA, Lindor KD. *Effect of ursodeoxycholic acid on serum lipids on patients with primary biliary cirrhosis.* Mayo Clin Proc 1994;69:923-9.
27. Poupon RE, Ouguerram K, Chretien Y, et al. *Cholesterol-lowering effect of ursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis.* Hepatology 1993;17:577-582.
28. Eusufzai S, Ericsson S, Cederlund T, Einarsson K, Angelin B. *Effect of ursodeoxychoic acid treatment on ileal absorption of bile acids in man as determined by the Se HCAT test.* Gut 1991;32:1044-8.
29. Salen G, Colalillo A, Verga D, Bagan E, Tint GS, Shefer S. *Effect of high and low doses of ursodeoxycholic acid on gallstone dissolution in humans.* Gastroenterology 1980;78:1412-18.
30. Hardison WGM, Grundy SM. *Effect of ursodeoxycholate and its taurine conjugate on bile acid synthesis and cholesterol absorption.* Gastroenterology 1984;87:130-5.

31. Bouscarel B, Fromm H, Ceryak S, Cassidy MM. *Ursodeoxycholic acid increases low-density lipoprotein binding, uptake and degradation in isolated hamster hepatocytes*. *Biochem J* 1991;280:589-98.
32. Angelin B, Eusufzai S. *Effects of ursodeoxycholic acid on plasma lipids*. *Scand J Gastroenterol* 1994;29 (Suppl)204:24-26.
33. Nilsell K, Angelin B, Leijd B, Einersson K. *Comparative effects of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on bile acid kinetics and biliary lipid secretion in humans: evidence for different modes of action on bile acid synthesis*. *Gastroenterology* 1983;85:1248-56.
34. Roda E, Roda A, Sama C, et al. *Effect of ursodeoxycholic acid administration on biliary lipid composition and bile acid kinetics in cholesterol gallstone patients*. *Dig Dis Sci* 1979;24:123-8.
35. Kraemer R, Rudeberg A, Hadorn B, Rossi E. *Relative underweight in cystic fibrosis and its prognostic value*. *Acta Paediatr Scand* 1978;67:33-37.
36. Carreau J-P, Frommel D, Nguyen TT, Mazliak P. *Hepatic delta-9 and delta-6 desaturase activities during the recovery period following carbon tetrachloride poisoning*. *Lipids* 1980;15:631-6.
37. Segarnick DJ, Cordasco DM, Agura V, Cooper NS, Rotrosen J. *Gamma-linolenic acid inhibits the development of the ethanol-induced fatty liver*. *Prostaglandins Leukot Med* 1985;17:277-282.
38. Goheen SC, Larkin EC, Manix M. *Dietary arachidonic acid reduces fatty liver, increases diet consumption and weight gain in ethanol-fed rats*. *Lipids* 1980;15:328-36.

39. Sokol RJ, Reardon MC, Accurso FJ, et al. *Fat-soluble-vitamin status during the first year of life in infants with cystic fibrosis indentified by screening of newborns.* Am J Clin Nutr 1989;50:1064-71.
40. Rasmussen M, Michalsen H, Lie SO, Nilsson A, Petersen LB, Norum KR. *Intestinal retinol esterification and serum retinol in children with cystic fibrosis.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1986;5:397-403.
41. Blomhoff R. *Transport and metabolism of vitamin A.* Nutr Rev 1994;52:S13-S23.
42. Scow RO, Blanchette-Mackie EJ, Smith LC. *Role of capillary endothelium in the clearance of chylomicrons: a model for ilpid transport from blood by lateral diffusion in cell membranes.* Circ Res 1976;39:149-56.
43. Blomhoff R, Green MH, Norum KR. *Vitamin A: physiological and biochemical processing.* Annu Rev Nutr 1992;12:37-57.
44. Underwood BA, Denning CR. *Blood and liver concentrations of vitamins A and E in children with cystic fibrosis.* Pediat Res 1972;6:26-31.
45. Rayner RJ, Tyrrel JC, Hiller EJ, et al. *Night blindness and conjunctival xerosis caused by vitamin A in patients with cystic fibrosis.* Arch Dis Child 1989;64:1151-6.
46. Smith FR, Underwood BA, Denning CR, Varma A, Goodman DS. *Depressed plasma retinol-binding protein levels in cystic fibrosis.* J Lab Clin Med 1978;80:423-33.
47. Smith FR, Goodman DS. *Vitamin A transport in human vitamin A toxicity.* N Engl J Med 1976;294:805-8.

48. Sarles J, Scheiner C, Sarran M, Giraud F. *Hepatic hypervitaminosis A: a familial observation.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1990;10:71-6.

Table 1. Clinical features of cystic fibrosis patients with liver disease at entry into the UDCA trial

| | Range normal | Patients with CF * |
|--------------------------------|--------------|--------------------|
| Weight (% expected) | 85-115 | 96 (74-125) |
| Height (% expected) | 85-115 | 100 (75-132) |
| Weight for height (% expected) | 85-115 | 96 (79-107) |
| Shwachman score | 85-100 | 80 (72-98) |
| AST (IU/L) | <43 | 67 (46-348) |
| ALT (IU/L) | <25 | 52 (27-186) |
| γ GT (IU/L) | <30 | 58 (35-194) |

* Median (range)

Table 2

EFFECTS OF URSODEOXYCHOLIC ACID ON LIVER-ENZYME PROFILE

| | Values normal | After 6 mo of placebo administration (n=19) | | After 6 mo UDCA (n=19) | | After 25 mo UDCA (n=13) | |
|-----|---------------|---------------------------------------------|------------|------------------------|-------------|-------------------------|--------------|
| | | (Mean±SEM) | (Mean±SEM) | (Mean±SEM) | (% Change) | (Mean±SEM) | (% Change) |
| AST | < 43 IU/L | 95.6±17.4 | 61.0±8.8 | 48.9±7.2* | (-28.2±9.2) | 47.0±9.5* | (-41.1±10.6) |
| ALT | < 25 IU/L | 70.8±10.7 | 40.3±6.8† | 27.0±5.7† | (-38.8±8.4) | 27.0±5.7† | (-35.7±15.7) |
| γGT | < 30 IU/L | 70.7±9.1 | 21.3±2.6†† | | (-68.3±3.1) | | (-58.7±9.8) |

Significant differences from placebo values.

* P<0.05

† P<0.01

†† P<0.001

Table 3
EFFECTS OF URSODEOXYCHOLIC ACID ON PLASMA LIPID CONCENTRATIONS

| | Range normal | After 6 mo of placebo administration (n=19) | After 6 mo UDCA (n=19) | After 25 mo UDCA (n=13) |
|----------------------------|-----------------|------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | (Mean±SEM) | (Mean±SEM) (% Change) | (Mean±SEM) (% Change) |
| Total fatty acids (g/L) | 2.23-4.50 | 2.89±0.18 | 2.15±0.10†† (-21.9±4.6) | 2.32±0.09† (-19.9±4.3) |
| Triglycerides (mmol/L) | 0.60-0.90 | 1.27±0.13 | 0.78±0.06† (-31.1±6.2) | 0.82±0.11† (-32.9±5.5) |
| Cholesterol (mmol/L) | 3.50-4.50 | 3.15±0.20 | 2.56±0.18†† (-18.4±4.3) | 2.74±0.17* (-13.7±5.8) |

Significant differences from placebo values.

* P<0.05

† P<0.01

†† P<0.001

Table 4
EFFECTS OF URSODEOXYCHOLIC ACID ON PLASMA FATTY ACID CONCENTRATIONS

| | Normal range | After 6 mo of placebo administration (n=19) | | After 6 mo UDCA (n=19) | | After 25 mo UDCA (n=13) | |
|---------------------|--------------|---------------------------------------------|-------------|------------------------|-------------|-------------------------|------------|
| | | (Mean±SEM) | (Mean±SEM) | (% Change) | (Mean±SEM) | (% Change) | (Mean±SEM) |
| 16:0 (%) | 19.0-24.2 | 25.08±0.58 | 23.92±0.55† | (-4.4±1.4) | 23.92±0.45 | (-1.7±1.7) | |
| 18:0 (%) | 6.3-8.1 | 7.50±0.20 | 7.68±0.19 | (3.0±2.2) | 7.29±0.22† | (-5.0±1.5) | |
| 16:1n-7 (%) | 1.3-2.8 | 4.10±0.33 | 3.77±0.30 | (-7.8±6.6) | 3.44±0.36 | (-12.2±8.6) | |
| 18:2n-6 (%) | 25.6-30.6 | 19.56±1.05 | 21.15±1.11* | (9.9±4.5) | 22.09±1.18* | (13.7±5.6) | |
| 20:3n-9 (%) | 0.11-0.32 | 0.47±0.04 | 0.36±0.04 | (-16.7±5.1) | 0.37±0.04 | (-16.6±8.2) | |
| 20:4n-6 (%) | 6.1-9.0 | 5.53±0.30 | 5.31±0.22 | (-2.4±2.7) | 6.35±0.38* | (4.9±2.4) | |
| 20:3n-9/20:4n-6 (%) | <3 | 9.29±1.08 | 8.86±1.48 | (-7.2±8.6) | 6.21±0.92* | (-22.1±9.1) | |

Significant differences from placebo values.

* P<0.05

† P<0.01

Table 5

EFFECTS OF URSODEOXYCHOLIC ACID ON PLASMA RBP, TRANSTHYRETIN, RETINOL AND RETINYL ESTER CONCENTRATIONS

| | Normal range | After 6 mo of placebo administration (n=14) | | After 6 mo UDCA (n=14) | | After 25 mo UDCA (n=13) | |
|-------------------------|----------------|---------------------------------------------|------------|------------------------|--------------|-------------------------|--------------|
| | | (Mean±SEM) | (% Change) | (Mean±SEM) | (% Change) | (Mean±SEM) | (% Change) |
| Transthyretin | 200-450 mg/L | 196.4±14.4 | | 167.6±10.5† | (-12.1±4.5) | 177.2±13.8* | (-10.5±5.8) |
| RBP | 30-80 mg/L | 28.1±4.3 | | 24.2±2.0 | (-3.6±4.6) | 23.8±2.7 | (-9.4±9.6) |
| Retinol | 0.7-2.8 µmol/L | 0.83±0.08 | | 0.75±0.07 | (-12.0±3.6) | 0.92±0.12 | (11.7±7.8) |
| Molar ratio retinol/RBP | 0.8-0.9 | 0.66±0.05 | | 0.70±0.04 | (-9.4±4.8) | 0.80±0.02* | (13.0±5.3) |
| Retinyl palmitate | <87 nmol/L | 151.7±53.6 | | 85.8±17.2 | (-20.0±20.3) | 75.6±14.4 | (-44.2±16.5) |
| | <3%†† | 13.7±3.6 | | 10.0±2.2 | (-11.1±18.3) | 8.1±1.7* | (-48.8±12.9) |

Significant differences from placebo values.

* P<0.05

† P<0.01

†† Percentage of total retinol circulating as retinyl palmitate.

CHAPITRE 4

**EXOGENOUS LIPID PEROXIDATION PRODUCTS ALTER
THE STRUCTURE AND FUNCTION OF PEROXISOMES**

Soumis à Am. J. Clin. Nutr.

**EXOGENOUS LIPID PEROXIDATION PRODUCTS ALTER THE
STRUCTURE AND FUNCTION OF PEROXISOMES**

Guy Lepage, Nancy Ronco, Josée Champagne, Pierre Russo and Claude C. Roy

From the Gastroenterology-Nutrition and Pathology Services, Department of
Pediatrics,
Hôpital Ste-Justine, Université de Montréal, Québec, Canada

This study was supported by a grant from the Canadian Cystic Fibrosis Foundation and by the Medical Research Council of Canada. We wish to thank Drs. Gail Sekas and Harbhajan S. Paul (Departments of Medicine and Molecular Genetics and Biochemistry, University of Pittsburgh, School of Medicine, Pittsburgh, PA) for their generous help with the technique to isolate hepatic peroxisomes and for their encouragement.

ABSTRACT

Peroxisomes play a key role in the cellular defense against free radical injury and are known to proliferate and upregulate their function in response to fat and to several compounds. Lipid peroxidation products have adverse health effects but it is not known whether they affect peroxisomes. Rats were assigned to one of three diets: control diet (C), essential fatty acid-deficient diet (EFAD), oxidized fat diet (OX) which had lost 97% of its essential fatty acid and 50% of its tocopheryl acetate during spontaneous peroxidation. During 12 weeks of ad libitum feeding, animals on the OX diet ate somewhat less, gained less weight and presented with frequent loose stools. Their levels of α -tocopherol and β -carotene were reduced whereas those of malondialdehyde were higher. Neither of the three groups showed evidence of hepatic steatosis. Both the OX and EFAD groups showed biochemical evidence of EFA deficiency. The rats on the OX diet had a reduction in plasma cholesterol whereas an increase in triglyceride concentration was noted in the EFAD group. The density of the hepatic peroxisome-enriched fraction, a reliable marker of a change in the size and structure of peroxisomes, was higher in the OX group. It was associated with an increment in the capacity of the peroxisomal fraction to β -oxidize palmitoyl-coenzyme A and in the activity of catalase. As the rats on the EFAD showed none of these changes, the data suggest that ingestion of lipid peroxidation products *per se* induce changes in peroxisomal structure and function leading to increased β -oxidation and catalase activities.

KEY WORDS: antioxidant defense, α -tocopherol, β -carotene, malondialdehyde, catalase, peroxisome, β -oxidation, oxidative stress, cholesterol, fatty acid.

INTRODUCTION

Peroxisomes are implicated in a broad spectrum of metabolic and synthetic activities. They also play a key role for the regulation of oxygen free radical concentrations in tissues as second messengers (1). Among its normal substrates, are the common long-chain fatty acids, steroids, dicarboxylic acids, prostaglandins, amino acids and oxygen free radicals. In addition, significant involvement of this organelle has been established in the synthesis of such important cellular constituents as cholesterol, bile acids and very long chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (eg docosahexaenoic acid at the stage of retroconversion) through peroxisomal β -oxidation (2).

A recent study in human livers has shown an increase in peroxisomes as well as in both catalase and peroxisomal β -oxidation activity in steatosis secondary to alcohol abuse and obesity (3). Of great interest is that a novel member of the steroid receptor gene superfamily, the peroxisome proliferated activated receptor (PPAR), is activated by fatty acids (4) and particularly by PUFAs (5). Since enzymes producing reactive oxygen species such as Oxidases, Cytochrome P-450, Cytochrome b5 reductase, Cytochrome P-450 reductase and the antioxidant enzyme systems such as CuZn superoxyde dismutase, Mn superoxyde dismutase, glutathion-peroxydase and catalase are found in peroxisomes (6), it is evident that peroxisomes play a significant role in the cellular antioxidant defense mechanisms.

Peroxisome proliferation is known to occur under many circumstances including drug administration, high fat diets and metabolic states (7-10). Exercise has been shown to increase the amount of lipid peroxidation and elevate catalase activity in liver (11). Moreover, ischemia reperfusion injury affects the morphology of peroxisomes (12) and their function (6). Lipid-oxidation products are known to have adverse effects in animals (13) but it is not known whether their toxicity may be partly kept in check by proliferation and activation of peroxisomes. The aim of this study was therefore to test the effect of exogenous lipid oxidation products on the structure and function of peroxisomes.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Breeding Laboratories (Montréal, Québec, Canada). Fifty rats weighing 70-80 g were allowed free access to water and food. After 1 week of acclimatization, they were randomly assigned to one of three diets, different by their fat content and composition. These animals were individually housed in wire-mesh-bottom stainless steel cages with tap water and diet available at all times. They were maintained at 22°C with 12-hour cycles of light and weighed periodically.

Following 10 wk on the special diets, ingesta were calculated during 3 d while feces were collected. At the end of the 12 week study, rats were sacrificed after a 18-h fast. Half of the rats of each group were bled under general anesthesia. The livers were rapidly removed and were homogenized in saline after samples were taken for light microscopy. Plasma was collected with EDTA as an anticoagulant and placed on ice. To avoid isomerization of carotenoids, aluminium foil was used to protect all blood samples from light as soon as they were drawn. Plasma was frozen at -80°C along with liver homogenates. The other half of each group of rats were decapitated; their livers were rapidly removed and processed for light microscopy and for preparation of a peroxisomal rich fraction.

Diet formulation

The composition of the three diets prepared by Zeigler Bros. Inc. (Gardners, PA) appears in **Table 1**. The source of lipids was corn oil in the control (C) and oxidized corn oil in the (OX) diet, while beef tallow was the source for the essential fatty acid deficient diet (EFAD). The C and EFAD diets were frozen in pellet form at -20°C under nitrogen. In contrast, the OX diet was powdered and stored at 5°C. The fatty acid content of the three diets were analyzed by GLC at the beginning and 10 weeks after the study had begun. While the total amount of FA was comparable in the C (179.0→176.2 $\mu\text{mol/g}$) and EFAD diets (195.1→191.8 $\mu\text{mol/g}$), only 36% of

FA remained in the OX diet (171.1→61.6 $\mu\text{mol/g}$) after having kept in powdered form at 5°C for 10 weeks. No change was observed in the FA pattern of the C and EFAD diets, except in that of the OX diet after 10 weeks. **Table 2** shows the FA composition of the three diets at that time. Ninety-seven % of the PUFAs were oxidized in the OX diet. The % of PUFAs remaining was close to that of the EFAD diet (**Table 2**). There was no change in the MDA content of the C (8.2 nmol/g) and of the EFAD diets (7.4 nmol/g) after 10 weeks. However peroxidation was evidenced by an increase in MDA (8.2→150.9 nmol/g) coupled with a profound decrease of tocopheryl acetate (104.7→49.5 nmol/g) in the OX diet.

Materials

Standards of retinol, α -tocopherol, tocopheryl acetate, β -carotene, retinyl palmitate and fatty acids were purchased from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). HPLC-grade water, ethanol, methanol, methylene chloride, hexane and acetonitrile were from BDH Inc (Ville St-Laurent, Québec). All solvents used for GLC analysis were glass distilled in our laboratory. Nycodenz was obtained from Accurate Chemical and Scientific Research Corporation (Westbury, NY). Acetyl-CoA, ADP, palmitoyl-CoA, NADH, NADPH, FAD, triton X-100, EDTA, Na_4EDTA , imidazole, rotenone, o-nitrophenyl acetate and dithiothreitol were obtained from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). Catalase was obtained from Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN). Titanium (IV) sulfate oxide hydrate was obtained from Strem Chemicals Inc. (Newburyport, MA). All other reagents were of analytical grade and were obtained from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO).

Microscopy

Fat content in the livers was examined by gas chromatography and by light microscopy. They were stained with hematoxylin and eosin. The degree of fatty changes were quantified by a pathologist (PR) in a blinded fashion in the following manner:

- Grade 0: The specimens contained no fat vacuoles.
- Grade I: The specimens contained fatty vacuoles in occasional foci of hepatocytes.
- Grade II: The specimens contained fatty vacuoles in one third or less of the liver cells.
- Grade III: The specimens contained fatty vacuoles in more than one third of the liver cells but less than two thirds of the cells.
- Grade IV: The specimens contained fatty vacuoles in two thirds or more of the liver cells.

Unstained sections were examined with a Zeiss microscope using epifluorescence illumination with a 200 W mercury lamp. Excitation and emission filters respectively of 490 nm and 520 nm were used, looking for the yellow-orange auto-fluorescence which is characteristically exhibited by lipofuscin.

Vitamin determinations

At the time of the assays, samples of plasma, liver and diet were thawed in the dark and aliquots were processed for analysis under subdued light. Samples of the different specimens were mixed in tubes for 0.5 min on a vortex mixer with 500 μ L internal standard (12 μ g of tocopheryl acetate in C_2H_5OH with 125 μ g ascorbic acid). Lipid soluble vitamins were extracted and analysed by HPLC as previously described (14).

Malondialdehyde determination

Proteins from plasma, liver and diet samples were precipitated as previously described (15) and supernatant was filtered through a 0.2 μ m cellulose acetate syringe filter. After complexing free MDA to TBA, an aliquot was injected into HPLC for separation and measurement at 532 nm of the MDA-TBA complex as previously described (16).

Lipid and fatty acid analyses

Plasma concentrations of total cholesterol, free cholesterol, and triglycerides (TG) were measured enzymatically by a commercial kit (Boehringer Mannheim, Montréal) as reported previously (17). Cholesteryl esters were calculated as the difference between total and unesterified cholesterol. Plasma, diet and hepatic fatty acid analyses by GLC were performed after direct transesterification as previously published (18). Benzene was replaced by hexane in the procedure which was proved to be as efficient and less toxic. The resulting FA methyl esters were injected into a 60-m fused silica capillary column coated with SP-2331. Analyses were performed on a Hewlett-Packard 5890 gas chromatograph. Helium was used as carrier gas (1.6 ml/min at 80°C) and nitrogen as make-up gas. The split ratio was 8:1. After an initial isothermal period of 6 min at 80°C, the temperature was programmed to 200 °C, rising by 2.9°C/min with a hold at that temperature for 5 min. The second increment was 0.3°C/min to 204°C. The last increment was 10 °C/min to 230°C and held at that temperature for 20 min. Injector and detector temperatures were 220°C and 250°C, respectively. The gas chromatograph was calibrated using standard mixtures of the different FA. Response-correcting factors were determined in mol/area ratios.

Isolation of peroxisomes from rat liver

Peroxisomes from the livers were isolated according to the procedures described by G. Sekas et al. (19). Briefly, livers were quickly chopped with a McIlwain mechanical tissue chopper. They were then homogenized 1:2 (w/v) with two up and down strokes in a Potter-Elvehjem type homogenizer with loose fitting pestle in ice-cold 0.25M sucrose containing 0.1% ethanol, 1 mM EDTA and 5 mM Tris/HCl pH 7.5. Liver homogenates were fractionated by differential centrifugation using a SW-28 rotor (Beckman Instruments) to obtain a peroxisome-enriched fraction (λ fraction) as outlined by Leighton et al. (20). The λ fraction was then subjected to isopycnic equilibrium density gradient centrifugation on a steep linear Nycodenz (10-60%) gradient made up with a Gradient Master from BioComp Instruments, Inc. (New Brunswick, Canada); 2 ml of the λ fraction prepared from

each liver were gently loaded on top of a 11 ml gradient. The gradient was centrifuged using a fixed angle 65-VTi rotor (Beckman Instruments) at 40 000 RPM for 50 min at 5°C. A total of 23-25 fractions were collected from the bottom of the centrifuge tube with a fraction recovery system (Beckman Instruments). The density of each fraction was calculated from its refractive index on an Erma refractometer. The location of peroxisomes in the gradient was determined based on the sedimentation in a density range of 1.20-1.26 g/cm³ (21) and from the activity of catalase, considered the marker enzyme of this organelle (22).

Assay of marker enzymes

All fractions were immediately analysed for catalase activity according to Leighton et al (20). The fractions containing the catalase peak were pooled and frozen at -80°C in aliquots. The peroxisomal β -oxidation of fatty acids was measured as described by Lazarow, as well as in the presence of KCN to exclude a mitochondrial contribution since KCN is an inhibitor of cytochrome oxidase, thereby blocking the generation of NADPH (23). Since Nycodenz interferes with protein determination by the Lowry method, protein concentration was measured with bicinchoninic acid (24) using bovine serum albumin as the standard. In order to assess the possible contamination of the peroxisomal-rich fraction by mitochondria and microsomes, the mitochondrial and microsomal marker enzymes, glutamate dehydrogenase and esterase were measured using the methods of Schmidt (25) and Beaufay (26) respectively.

Statistical analysis

All results are expressed as means \pm SEs. Data were analysed using one-way analysis of variance (ANOVA) factoring for group and by comparison among mean tests. Simple linear regression and Pearson correlation coefficient were used. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Tolerance for the three diets was good except for the group on the OX diet during the last two weeks of the study. They showed a decreased intake and frequent loose stools (Table 3). As a result, the rate of weight gain and final weight were lower than in the two other groups on the C and on the EFAD diets. Relative liver weight was increased in the OX group. However, there was no difference in the protein content between the three groups. The overall architecture of the rat livers from the 3 groups was normal. No significant inflammation or necrosis was seen. Hepatic steatosis was not observed nor was there evidence of lipofuscin. In fact, no fat vacuoles were noted in the OX group and the fat content score of the EFAD animals (1.9 ± 0.3) did not differ from that of the controls (1.7 ± 0.2).

The effects of peroxidized lipids on plasma and liver MDA concentrations are shown in Table 4. While no change was seen in the EFAD group, the OX rats increased their plasma and liver MDA levels by 47% and 77% respectively. Strong negative correlations were found between MDA plasma levels and hepatic content of α -tocopherol ($r = -0.84$, $P < 0.0001$) and of β -carotene ($r = -0.74$, $P = 0.0004$). This negative correlation also existed between plasma levels of MDA and α -tocopherol ($r = -0.74$, $P < 0.001$).

As shown in Table 5, EFA deficiency had no effect on plasma concentrations of lipid soluble vitamins. In contrast, feeding of the OX diet profoundly decreased plasma and hepatic levels of α - and γ -tocopherol. No difference was seen in plasma retinol levels from the three groups. Hepatic retinyl palmitate was decreased in animals maintained on the OX diet, while an increment was observed in rats maintained on the EFAD diet. There were strong correlations between hepatic levels of α -tocopherol and β -carotene ($r = 0.81$, $P < 0.0001$), α -tocopherol and retinyl palmitate ($r = 0.67$, $P < 0.002$) as well as retinyl palmitate and β -carotene ($r = 0.66$, $P < 0.002$).

Table 6 summarizes data on plasma lipids from the three groups. A modest 37% decrease of triglycerides was noted in the OX group while there was a significant increase of 83% in the EFAD group. Total and free cholesterol were decreased by 63% and 73% respectively in rats maintained on the OX diet while cholesteryl esters were increased.

Total plasma FA were decreased by more than 50% in the OX group (**Table 7**). The plasma FA patterns showed evidence of essential fatty acid deficiency in the animals on the OX and EFAD diets. Levels of linoleic and of arachidonic acid were decreased by 54% and 32% respectively in the OX group while the reduction reached 74% and 55% in the EFAD group. These changes were associated with large increases ($P < 0.0001$) in the ratio of 20:3 n -9 to 20:4 n -6 for the OX (0.194 ± 0.024) and EFAD rats (0.432 ± 0.024) when compared to the C rats (0.004 ± 0.001) ($P < 0.001$).

Total hepatic fatty acids were reduced by 30% in the OX group (**Table 8**). Linoleic acid was lower by 59% and 81% in the OX and EFAD rats respectively while arachidonic acid was only decreased in the EFAD group. Very large significant increases in the ratio of 20:3 n -9 to 20:4 n -6 were observed in the liver of OX (0.206 ± 0.028) and of EFAD rats (0.383 ± 0.020) when compared to control animals (0.004 ± 0.001). The n -3 family of PUFA was less affected. Both 18:3 n -3 and 22:5 n -3 were reduced, but 22:6 n -3 concentration was unchanged.

Table 9 summarizes the effects of the 3 different diets on the liver peroxisomal structure and enzyme activities. EFA deficiency had no effect *per se*. However, the OX rats were found to have an enriched peroxisomal fraction of greater density. In the same group, there was a 4-fold increase in the protein content of the peroxisome-rich fraction. It was found to be due to significant contamination by microsomes in view of the fact that esterase activity was increased 3.3 fold (data not shown). There was no evidence of mitochondrial contamination since the activity of glutamate dehydrogenase was very low and the same in the three groups (data not shown). Palmitoyl CoA oxidation activity was increased 7-fold and no further increase was noted when the assay was run without KCN (data not shown). Feeding

oxidized lipids had a similar effect on catalase activity which showed a 2.4-fold increment, leading to a 3-fold increase in the ratio between the two enzymes. Peroxisomal density was strongly correlated ($P < 0.0001$) with the palmitoyl CoA oxidation ($r = 0.93$) and catalase activities ($r = 0.77$).

DISCUSSION

The autoxidation of unsaturated lipids contained in fats and food and the endogenous oxidative degradation of membrane lipids by lipid peroxidation result in the formation of a very complex mixture of lipid hydroperoxides, chain-cleavage products, and polymeric material (13). In this study 97% of PUFAs from the OX diet were lost after being submitted to ambient air for 10 weeks. It is believed that autoxidation products of PUFA can be absorbed by rats and accumulated in the liver (27), although thermally oxidized oil which is the higher molecular-weight polymer is not (28). In the present study, the feeding of oxidized lipids led to diarrhea, decreased weight gain and biochemical evidence of EFA deficiency and of lipid peroxidation coupled with a decrease of antioxidant vitamins. More importantly, there was a significant increase in the density of peroxisomes as well as in the activity of palmitoyl CoA-oxidase and catalase.

Even though oxidized oils given orally are not considered acutely toxic, chronic feeding in rats leads to loss of appetite, impaired growth and diarrhea (13). This was confirmed in the present study but there was only a small increase in liver weight. This is in contrast with the large hepatomegaly observed in other reports (13,28). Similarly, while it is commonly present in EFA deficiency (29) because of runaway activation of genes encoding lipogenic enzymes, hepatomegaly was absent in the rats fed the EFAD diet (30). Although plasma TG were increased in the EFAD group, there was no evidence of steatosis histologically nor biochemically. This is explained by the fact that the degree of EFA deficiency assessed by the ratio of 20:3n-9 to 20:4n-6 was more modest (0.432 ± 0.024) than in a previous study (1.410 ± 0.415) (31).

Oxidative rancidity decreases the nutritional quality of food. Lipid peroxides and the free radicals they generate destroy fat soluble vitamins and react with sulphhydryl bonds in proteins (32). In response to the feeding of oxidized lipids depleted of PUFAs as well as of dietary antioxidants, vitamin E and β -carotene, there was an increase in both plasma and hepatic MDA, a classic marker of lipid

peroxidation (33). This increase could be the result of the absorption of preformed dietary MDA since its absorption has been demonstrated in rats (33,34). However, it could also be indicative of endogenous lipid peroxidation (35). There was a marked decrease of plasma and hepatic α -tocopherol and β -carotene in the rats fed oxidized lipids, thereby, confirming other observations (36,37). Moreover, there was a striking negative correlation between MDA plasma concentrations and plasma as well as hepatic concentrations of β -carotene as well as of both α - and γ -tocopherol. The latter was recently reported to inhibit formation of lipid hydroperoxide more effectively than α -tocopherol when liposomes were exposed to peroxyxynitrite (38). In contrast to the situation in humans, where concentrations of α -tocopherol are 5-fold higher than γ -tocopherol, the plasma concentration of γ -tocopherol in the rat is 20-fold higher than that of α -tocopherol. Its depleted plasma concentration in the OX group is the likely result of its antioxidant activity.

Changes in the plasma lipid profiles manifested by a marked decrease in cholesterol and by a more modest one in triglycerides of the OX fed group cannot be explained by essential fatty acid deficiency since the animals with EFA deficiency showed the expected increase in TG but no change in cholesterol levels. At this juncture, it can only be surmised that free radicals could have oxidized cholesterol (39). Essential fatty acid deficiency ratio of 20:3 n -9 to 20:4 n -6 observed in the OX group was not as severe as in the EFAD. This is likely explained by the fact that in the latter there was ingestion of a PUFA depleted diet for the entire period of 12 weeks while there was a progressive depletion of PUFAs in the OX diet exposed to environmental oxygen. This is further confirmed by changes in the PUFA profiles showing a more profound decrease of linoleic and α -linolenic acid and of most of their metabolites except for EPA and DHA end products of n -3 desaturation. The latter were more profoundly affected in plasma of the OX group. It is known that n -3 FAs are more vulnerable to autoxidation (40) and that Δ 5 and Δ 6 desaturase activities are induced by peroxisomal proliferators (41). It may well explain why a strong negative correlation was found between hepatic MDA and DHA.

In the present study, there was significant contamination of peroxisomes by microsomes evidenced by the 3.3-fold increase in esterase. It largely explains the 4-fold increase in protein content of the peroxisomal fractions from the OX group. A possible interpretation is that there was a shift in the density of the microsomal fraction towards the peroxisomes in view of the susceptibility of the former to lipid peroxidation (42). On the basis of the findings, we therefore elected to express the peroxisomal enzyme activities per gram of liver weight. As glutamate dehydrogenase activity was minimal and the same in the three groups, we can conclude that the increased palmitoyl-CoA oxidase activity in the group fed OX diet was induced by oxidized lipids.

Oxidized lipids cannot be transported across the two mitochondrial membrane leaflets to subsequently undergo β -oxidation in view of their molecular configuration (43). Thus, lipid hydroperoxides, cyclic peroxides, cyclic endoperoxides from PUFA oxidation are directed to peroxisomes for β -oxidation, the products of which can then be taken up by the mitochondrial machinery. As a general rule, the peroxisomal proliferation process is induced in response to overload or inhibition of mitochondrial fatty acid oxidation (10) and it is known that dietary products of lipid peroxidation can decrease the activities of mitochondrial enzymes (35). Moreover, PPAR α gene is regulating the plasma thiobarbituric acid-reactive substance level (44).

The home of catalase activity is the peroxisome. It is the key enzyme responsible for the metabolism of H₂O₂ (45). A large increase in the latter is predictable as a consequence of the ingestion of lipid peroxides (46) and as a result of increased β -oxidation since it is the end product of that peroxisomal metabolic pathway (47). The fact that catalase activity showed a smaller increase than palmitoyl-CoA oxidase could relate to observations reporting that the leakiness of peroxisomal membranes is selective (48). They are particularly leaky for catalase and thiolase whereas other proteins such as Palmitoyl-CoA oxidase are much less prone to be released (48). In this study the ratio of palmitoyl-CoA oxidase to catalase was increased 3-fold in the OX fed group. This is less than the 5-fold ratio shown

with clofibrate treatment (49), but more than the 1.2-fold found in mice treated with eicosapentanoic acid (50). The greater the difference in the extent degree of induction between palmitoyl-CoA oxidase and catalase, the more the imbalance would be in cellular H_2O_2 metabolism.

The present study suggests that dietary peroxidized lipids can be added to the list of previously reported peroxisome proliferators which include hypolipidemic drugs such as clofibrate, phthalate ester plasticizers, and herbicides (51). However, in contrast to the response of peroxisomes to xenobiotic proliferators where there is no concomitant increase of catalase and palmitoyl-CoA oxidase, our data show a strong correlation between both. Similar observations were reported upon feeding a commercial fish oil preparation in which lipid peroxides could have been present even though it contained α -tocopherol (52). Our results are in agreement with those of another study carried out in rats submitted to a vitamin E deficient diet (53). It is tempting to suggest that the increased peroxisomal activity could have been secondary to the increased production of free radicals (54).

In summary, we have shown that ingestion of oxidized lipids increased plasma and hepatic MDA, and led to a profound depletion of α - and γ -tocopherol as well as of β -carotene. Plasma and hepatic FA, particularly PUFA, were also dramatically reduced. The secondary autoxidation products of PUFAs produced an enhancement of peroxisomal density and large increases of both, β -oxidation and catalase enzyme activities. This effect was not mediated by essential fatty acid deficiency as shown by the results obtained in the EFAD group. In conclusion our study suggests that oxidized lipids are peroxisome proliferators and this effect may in part be due to the fact that in contrast to mitochondria, peroxisomes play an important role in the detoxification of cells following ingestion of oxidized lipids.

REFERENCES

1. Masters CJ. *Cellular signalling: The role of the peroxisome*. Cell Signal 1996;8:197-208.
2. Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprecher H. *The metabolism of 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of a 4-desaturase*. J Biol Chem 1991;266:19995-20000.
3. De Craemer D, Pauwels M, Van Den Branden C. *Alterations of peroxisomes in steatosis and the human liver: A quantitative study*. Hepatology 1995;22:744-52.
4. Göttlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson J. *Fatty acids activate a chimera of the clofibrilic acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor*. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:4653-7.
5. Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. *Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers*. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:2160-4.
6. Kremser K, Kremser-Jezik M, Singh I. *Effect of hypoxia-reoxygenation on peroxisomal functions in cultured human skin fibroblasts from control and Zellweger syndrome patients*. Free Radic Res 1995;22:39-46.
7. Reddy JK, Warren JR, Reddy MK, Lalwani ND. *Hepatic and renal effects of peroxisome proliferators: biological implications*. Ann NY Acad Sci 1982;386:81-110.
8. Nalbhone G, Léonardi J, Termine E, et al. *Effects of fish oil, corn oil and lard diets on lipid peroxidation status and glutathione peroxidase activities in rat heart*. Lipids 1989;24:179-86.

9. Vamecq J, Draye JP. *Pathophysiology of peroxisomal beta-oxidation*. Essays Biochem. 1989;24:115-25.
10. Vamecq J, Vallee L, Lechêne de la Porte P, et al. *Effect of various n-3/n-6 fatty acid ratio contents of high fat diets on rat liver and heart peroxisomal and mitochondrial β -oxidation*. Biochim Biophys Acta 1993;1170:151-6.
11. Alessio HM, Goldfarb AH. *Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: Adaptive response to training*. J Appl Physiol 1988;64:1333-6.
12. Singh AK, Gulati S. *Effect of ischemia-reperfusion injury on the morphology of peroxisomes*. Mol Cell Biochem 1995;144:19-26.
13. Esterbauer H. *Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products*. Am J Clin Nutr 1993;57 Suppl:779S-86S.
14. Lepage G, Paradis K, Lacaille F, et al. *Ursodeoxycholic acid improves the hepatic metabolism of essential fatty acids and retinol in children with cystic fibrosis*. J Pediatr 1997;130:52-8.
15. Lepage G, Munoz G, Champagne J, Roy CC. *Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem 1991;197:277-83.
16. Lepage G, Champagne J, Ronco N, et al. *Supplementation with carotenoids corrects increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis*. Am J Clin Nutr 1996;64:87-93.
17. 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;29:215-26.
18. Lepage G, Roy CC. *Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction*. J Lipid Res 1986;27:114-20.

19. Sekas G, Paul HS. *Inhibition of carnitine acyltransferase activities by bile acids in rat liver peroxisomes*. Biochim Biophys Acta 1992;1125:196-202.
20. Leighton F, Poole B, Beaufay H, et al. *The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339*. J Cell Biol 1968;37:482-513.
21. Thompson SL, Krisans SK. *Rat liver peroxisomes catalyse the initial step in cholesterol synthesis*. J Biol Chem 1990;265:5731-5.
22. de Duve C, Baudhuin P. *Peroxisomes (microbodies and related particles)*. Physiol Rev 1966;46:323-57.
23. Lazarow PB. *Assay of peroxisomal beta-oxidation of fatty acids*. Methods Enzymol 1981;72:315-9.
24. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem 1985;150:76-85.
25. Schmidt E. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis, 2nd ed*. New York: Academic Press, 1974:650-6.
26. Beaufay H, Amar-Costesec A, Feytmans E, et al. 1974. *Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver*. J Cell Biol 1974;61:188-200.
27. Aw TY, Williams MW. *Intestinal absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids in rats: effect of exogenous GSH*. Am J Physiol 1992;263:G665-72.
28. Kanazawa K, Konazawa E, Ntake M. *Uptake of secondary autoxidation products of linoleic acid by the rat*. Lipids 1985;20:412-9.
29. Yamanaka WK, Clemans GW, Hutchinson ML. *Essential fatty acid deficiency in humans*. Prog Lipid Res 1981;19:187-215.

30. Clarke SD, Jump DB. *Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription*. *Annu Rev Nutr* 1994;14: 83-98.
31. Levy E, Thibault L, Garofalo C, et al. *Combined (n-3 and n-6) essential fatty acid deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes*. *J Lipid Res* 1990;31:2009-17.
32. Sanders TAB. *Nutritional aspects of rancidity*. In: *Rancidity in Foods*. Elsevier. 1989:125-39.
33. Draper HH, Polensek L, Hadley M, McGirr LG. *Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues*. *Lipids* 1984;19:836-43.
34. Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Feingold KR. *Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats*. *J Lipid Res* 1996;37:420-30.
35. Kanazawa K, Ashida H. *Target enzymes on hepatic dysfunction caused by dietary products of lipid peroxidation*. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:71-8.
36. Izaki Y, Yoshikawa S, Uchiyama M. *Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats*. *Lipids* 1984;19:324-31.
37. Liu JF, Huang CJ. *Tissue α -tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil*. *J Nutr* 1995;125:3071-80.
38. Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell-Keely PT, Duncan MW, Ames BN. *γ -tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO_x and complements α -tocopherol: Physiological implications*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3217-22.

39. Kubow S. *Lipid oxidation products in food and atherogenesis*. Nutr Rev 1993;51:33-40.
40. Esterbauer H, Cheeseman KH. *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal*. Meth Enzymol 1990;186:407-21.
41. Gronn M, Christensen E, Hagve T-A, Christophersen BO. *Effects of clofibrate feeding on essential fatty acid desaturation and oxidation in isolated rat liver cells*. Biochim Biophys Acta 1992;1123:170-6.
42. Cai Y, Sohlenius A-K, Anderson K, Sundberg C, De Pierre JW. *Effects of acetylsalicylic acid on parameters related to peroxisome proliferation in mouse liver*. Biochem Pharmacol 1994;47:2213-9.
43. Singh H, Beckman K, Poulos A. *Peroxisomal β -oxidation of branched chain fatty acids in rat liver*. Evidence that carnitine palmitoyltransferase I prevents transport of branched chain fatty acids into mitochondria. J Biol Chem 1994;269:9514-20.
44. Inoue I, Noji S, Shen MZ, Takahashi K, Katayama S. *The peroxisome proliferator-activated receptor $_{\alpha}$ (PPAR $_{\alpha}$) regulates the plasma thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) level*. Biochem Biophys Res Commun 1997;237:606-10.
45. Harris ED. *Regulation of antioxidant enzymes*. FASEB J 1992;6:2675-83.
46. Ito A, Watanabe H, Naito M, Naito Y. *Induction of duodenal tumors in mice by oral administration of hydrogen peroxide*, Gann 1981;72:174-5.
47. Lazarow PB, de Duve C. *A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes: enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug*. Proc Natl Acad Sci USA 1976;73:2043-6.

48. Wilcke M, Hultenby K, Alexson SEH. *Novel peroxisomal populations in subcellular fractions from rat liver. Implications for peroxisome structure and biogenesis.* J Biol Chem 1995;270:6949-58.
49. Reddy JK, Lalwani ND. *Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans.* Crit Rev Toxicol 1983;12:1-58.
50. Demoz A, Willumsen N, Berge RK. *Eicosapentaenoic acid at hypotriglyceridemic dose enhances the hepatic antioxidant defense in mice.* Lipids 1992;27:968-71.
51. Kaikous RM, Chan WK, Lysenko N, Ray R, de Montellano PRO, Bass NM. *Induction of peroxisomal fatty acid β -oxidation and liver fatty acid-binding protein by peroxisome proliferators.* J Biol Chem 1993;268:9593-603.
52. De Craemer D, Vamecq J, Roels F, Vallée L, Pauwels M, Van Den Branden C. *Peroxisomes in liver, heart, and kidney of mice fed a commercial fish oil preparation: Original data and review on peroxisomal changes induced by high-fat diets.* J Lipid Res 1994;35:1241-50.
53. Reddy JK, Lalwani ND, Dabholkar AS, Reddy MK, Qureshi SA. *Increased peroxisomal activity in the liver of vitamin E deficient rats.* Biochem Int 1981;3:41-9.
54. Reddy JK, Lalwani ND, Reddy MK, Qureshi SA. *Excessive accumulation of autofluorescent lipofuscin in the liver during hepatocarcinogenesis by methyl clofenapate and other hypolipidemic peroxisome proliferators.* Cancer Res 1982;42:259-66.

Table 1.

COMPOSITION OF RAT DIETS

Macro and micro-nutrients content of the three diets
(g/100 g)

| | |
|-----------------------|------|
| Sucrose | 50.0 |
| Casein (vitamin-free) | 20.0 |
| Corn starch | 15.0 |
| Fat ¹ | 5.0 |
| Fiber (non nutritive) | 5.0 |
| Mineral mixture | 3.5 |
| Vitamin mixture | 1.0 |
| DL-Methionine | 0.3 |
| Choline bitartrate | 0.2 |

¹ The fat source in the Control (C) and Oxidized fat (OX) diets was corn oil while it was beef tallow in the essential fatty acid deficiency (EFAD) diet.

Table 2.

FATTY ACID COMPOSITION OF SEMISYNTHETIC DIETS ($\mu\text{mol/g}$) 10 WEEKS AFTER THE BEGINNING

| Fatty acids | C | OX | EFAD |
|--------------------------------|-------|------|-------|
| 12:0 | 0.2 | 0.2 | 0.6 |
| 14:0 | 0.9 | 1.0 | 9.8 |
| 15:0 | 0.2 | 0.1 | 1.2 |
| 16:0 | 21.7 | 21.0 | 58.5 |
| 17:0 | 0.2 | 0.2 | 2.3 |
| 18:0 | 5.5 | 5.5 | 28.0 |
| 20:0 | 0.7 | 0.7 | 0.2 |
| 22:0 | 0.4 | 0.3 | ND |
| 24:0 | 0.4 | 0.3 | ND |
| Σ Saturated (%) | 17.1 | 47.9 | 52.4 |
| 14:1 <i>n</i> -5 | 0.5 | 0.2 | 3.1 |
| 16:1 <i>n</i> -7 | 0.4 | 0.4 | 7.9 |
| 18:1 <i>n</i> -7 | 1.4 | 1.0 | 2.9 |
| 18:1 <i>n</i> -9 | 41.8 | 27.3 | 71.2 |
| 20:1 <i>n</i> -9 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| Σ Monounsaturated (%) | 25.2 | 47.4 | 44.5 |
| 18:2 <i>n</i> -6 | 97.8 | 2.0 | 5.2 |
| 18:3 <i>n</i> -3 | 3.9 | 0.2 | 0.6 |
| 20:2 <i>n</i> -6 | ND | ND | 0.2 |
| Σ Polyunsaturated (%) | 57.7 | 4.7 | 3.1 |
| Total FA ($\mu\text{mol/g}$) | 176.2 | 61.6 | 191.8 |

Results are given as mean for three analyses. ND, not determined because the concentration of fatty acid was too small to quantify accurately.

Table 3.

THE EFFECT OF DIETS ON INTAKE, FECES, LIVER AND BODY WEIGHTS¹

| | C (15) | OX (20) | EFAD (15) |
|--------------------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| Intake (g/d) | 24.3±0.7 ² | 21.0±0.7 ³ | 23.9±0.7 ² |
| Feces (g/d) | 2.42±0.10 ² | 3.03±0.10 ³ | 2.37±0.11 ² |
| Final body weight (g) | 486.9±5.2 ² | 403.3±12.4 ³ | 467.0±9.9 ² |
| Relative liver weight (g/100 g body wt) | 2.64±0.04 ² | 3.00±0.07 ³ | 2.61±0.06 ² |

¹ X±SEM.

^{2,3} Values without a common superscript are significantly different from other in the same row (P<0.05). A three day stool collection was done 10 weeks after beginning of the study. Food intake was monitored at that time. Liver and body weights were registered at sacrifice at the end of the 12 week study.

Table 4.**EFFECT OF DIETS ON PLASMA AND HEPATIC MALONDIALDEHYDE¹**

| | C | OX | EFAD |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| | (6) | (7) | (6) |
| Plasma MDA (nmol/L) | 107.4±9.5 ² | 158.3±11.4 ³ | 90.9±9.6 ² |
| Liver MDA (pmol/mg protein) | 6.9±1.2 ² | 12.2±2.1 ³ | 9.0±2.5 ² |

¹ X±SEM.

^{2,3} Values without a common superscript are significantly different from others in the same row (P<0.05).

Table 5.

EFFECT OF DIETS ON PLASMA AND HEPATIC CONCENTRATIONS OF α -
AND γ -TOCOPHEROL, β -CAROTENE AND RETINOL¹

| | C (6) | OX (6) | EFAD (7) |
|-------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| PLASMA | | | |
| α -tocopherol (mg/dL) | 1.26±0.16 ² | 0.11±0.01 ³ | 1.17±0.10 ² |
| γ -tocopherol (mg/dL) | 29.14±8.34 ² | 1.37±0.49 ³ | 19.04±6.02 ² |
| Retinol (μ g/dL) | 75.1±4.8 | 60.6±7.8 | 85.0±7.1 |
| LIVER | | | |
| α -tocopherol (μ g/g protein) | 161.5±13.9 ² | 19.6±1.1 ³ | 186.6±11.1 ² |
| γ -tocopherol (μ g/g protein) | 1.31±0.17 | 1.05±0.22 | 1.00±0.09 |
| β -carotene (ng/g protein) | 87.9±18.8 ² | 0 ³ | 96.1±9.9 ² |
| Retinyl palmitate (μ g/g protein) | 338.0±23.8 ² | 202.0±27.1 ³ | 461.2±45.8 ⁴ |

¹ X±SEM.

^{2,3,4} Values without a common superscript are significantly different from others in the same row (P<0.05).

Table 6.THE EFFECT OF DIETS ON PLASMA LIPIDS¹

| | C | OX | EFAD |
|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | (6) | (7) | (7) |
| Triglycerides (mmol/L) | 0.81±0.27 ² | 0.51±0.11 ² | 1.48±0.16 ³ |
| Total cholesterol (mmol/L) | 3.18±0.28 ² | 1.17±0.08 ³ | 2.78±0.21 ² |
| Free cholesterol (mmol/L) | 1.00±0.14 ² | 0.27±0.03 ³ | 0.80±0.06 ² |
| Cholesteryl esters (%) | 69.2±2.0 ² | 77.3±1.6 ³ | 71.1±0.7 ² |

¹ X±SEM.

^{2,3} Values without a common superscript are significantly different from others in the same row (P<0.05). Cholesteryl esters were calculated as the difference between total and unesterified cholesterol and were expressed as % of total cholesterol.

Table 7.
PLASMA FATTY ACID COMPOSITION (mol%) FROM RATS FED VARIOUS
DIETS¹

| Fatty Acids | C (6) | OX (7) | EFAD (7) |
|-------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 14:0 | 0.30±0.02 ² | 0.32±0.02 ² | 0.50±0.40 ³ |
| 15:0 | 0.11±0.01 | 0.14±0.01 | 0.12±0.00 |
| 16:0 | 19.15±0.92 ² | 21.91±0.27 ³ | 21.90±0.57 ³ |
| 17:0 | 0.15±0.01 ² | 0.16±0.00 ² | 0.26±0.00 ³ |
| 18:0 | 9.40±0.52 | 10.35±0.46 | 11.14±0.56 |
| 20:0 | 0.06±0.00 | 0.07±0.00 | 0.06±0.00 |
| 22:0 | 0.18±0.02 ² | 0.27±0.01 ³ | 0.28±0.01 ³ |
| 24:0 | 0.38±0.04 | 0.42±0.02 | 0.31±0.01 |
| 26:0 | 0.011±0.001 ² | 0.015±0.00 | 0.008±0.00 |
| 16:0 DMA | 0.09±0.01 ^{2,3} | 0.11±0.01 ² | 0.06±0.00 ³ |
| 18:0 DMA | 0.05±0.00 ² | 0.07±0.01 ² | 0.03±0.00 ³ |
| Σ Saturated | 29.75±0.39 ² | 34.05±0.27 ³ | 34.57±0.20 ³ |
| 16:1n-7 | 1.86±0.24 ² | 2.63±0.15 ³ | 3.88±0.25 ⁴ |
| 18:1n-7 | 2.13±0.14 ² | 2.18±0.04 ² | 2.94±0.07 ³ |
| 18:1n-9 | 8.02±1.65 ² | 18.67±1.36 ³ | 24.27±0.77 ⁴ |
| 18:1n-9 tr. | 0.02±0.00 ² | 0.05±0.00 ³ | 0.12±0.00 ⁴ |
| 20:1n-7 | 0.17±0.03 | 0.09±0.02 | 0.10±0.01 |
| 20:1n-9 | 0.05±0.0 ² | 0.07±0.00 ³ | 0.15±0.02 ⁴ |
| 24:1n-9 | 0.25±0.03 ^a | 0.48±0.04 ³ | 0.41±0.03 ³ |
| 18:1DMA | 0.04±0.00 | 0.05±0.00 | 0.03±0.00 |
| Σ Monounsaturated | 12.70±1.91 ^a | 24.45±1.43 ³ | 32.25±0.89 ⁴ |
| 18:2n-6 | 12.96±1.14 ^a | 5.97±0.20 ³ | 3.34±0.24 ⁴ |
| 18:2n-6 tr. | 0.00±0.00 ^a | 0.01±0.00 ³ | 0.09±0.01 ⁴ |
| 18:3n-3 | 0.18±0.03 ^a | 0.05±0.00 ³ | 0.05±0.00 ³ |
| 18:3n-6 | 0.29±0.01 | 0.21±0.01 ³ | 0.19±0.01 ² |
| 20:2n-6 | 0.14±0.01 ² | 0.06±0.00 ³ | 0.11±0.00 ² |
| 20:3n-6 | 0.29±0.02 ² | 0.59±0.01 ³ | 0.75±0.04 ⁴ |
| 20:3n-9 | 0.14±0.02 ² | 5.12±0.58 ³ | 7.67±0.47 ⁴ |
| 20:4n-6 | 39.74±3.34 ² | 26.98±1.54 ³ | 17.81±0.81 ⁴ |
| 20:5n-3 | 0.07±0.00 ² | 0.05±0.00 ² | 0.14±0.01 ³ |
| 22:4n-6 | 0.71±0.11 ² | 0.21±0.04 ³ | 0.08±0.02 ⁴ |
| 22:5n-3 | 0.32±0.02 ² | 0.10±0.01 ³ | 0.15±0.02 ³ |
| 22:6n-3 | 2.71±0.15 ² | 2.01±0.05 ³ | 2.70±0.12 ² |
| Σ Polyunsaturated | 57.55±2.26 ² | 41.51±1.55 ³ | 33.18±0.97 ⁴ |
| TOTAL FA (mmol/L) | 11.37±2.30 ² | 5.53±0.42 ³ | 11.13±0.92 ² |

¹ X±SEM.

^{2,3,4} Values without a common superscript are significantly different from others in the same row (P<0.05).

Table 8.

HEPATIC FATTY ACID COMPOSITION (mol%) FROM RATS FED VARIOUS DIETS¹

| Fatty Acids | C (6) | OX (7) | EFAD (7) |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 12:0 | 0.11±0.00 ² | 0.13±0.00 ³ | 0.12±0.00 ² |
| 14:0 | 0.57±0.07 ² | 0.27±0.02 ³ | 0.61±0.07 ² |
| 15:0 | 0.11±0.00 ^{2,3} | 0.09±0.00 ² | 0.13±0.00 ³ |
| 16:0 | 22.64±0.91 | 21.07±0.77 | 23.06±1.31 |
| 17:0 | 0.16±0.01 ² | 0.19±0.01 ² | 0.25±0.00 ³ |
| 18:0 | 12.09±0.80 ² | 19.74±0.73 ³ | 14.51±1.32 ² |
| 20:0 | 0.05±0.00 | 0.05±0.00 | 0.05±0.00 |
| 22:0 | 0.12±0.01 ² | 0.21±0.01 ³ | 0.22±0.01 ³ |
| 24:0 | 0.32±0.02 ² | 0.44±0.03 ³ | 0.29±0.02 ² |
| 26:0 | 0.006±0.001 ² | 0.010±0.001 ² | 0.005±0.000 ³ |
| 16:0 DMA | 0.12±0.01 | 0.14±0.00 | 0.12±0.01 |
| 18:0 DMA | 0.11±0.01 ² | 0.16±0.00 ³ | 0.13±0.01 ² |
| Σ Saturated | 36.18±0.57 ² | 42.33±1.45 ³ | 39.38±0.22 ³ |
| 14:1n-5 | 0.04±0.01 ² | 0.00±0.00 ² | 0.10±0.01 ³ |
| 16:1n-7 | 3.57±0.51 ² | 2.03±0.11 ³ | 4.29±0.46 ² |
| 18:1n-7 | 2.97±0.07 | 2.79±0.21 | 3.24±0.15 |
| 18:1n-9 | 13.29±1.52 ² | 13.33±0.45 ² | 23.91±1.65 ³ |
| 18:1n-9 tr. | 0.08±0.00 ² | 0.16±0.02 ³ | 0.19±0.00 ³ |
| 20:1n-9 | 0.07±0.00 ² | 0.07±0.00 ³ | 0.11±0.00 ³ |
| 24:1n-9 | 0.11±0.00 ² | 0.20±0.01 ³ | 0.18±0.02 ³ |
| Σ Monounsaturated | 20.66±2.17 ² | 19.02±0.64 ² | 34.08±2.53 ³ |
| 18:2n-6 | 13.66±0.57 ² | 5.61±0.30 ³ | 2.65±0.25 ⁴ |
| 18:3n-3 | 0.21±0.01 ² | 0.02±0.00 ³ | 0.02±0.00 ³ |
| 18:3n-6 | 0.22±0.01 ² | 0.12±0.01 ³ | 0.09±0.00 ⁴ |
| 20:2n-6 | 0.19±0.00 ² | 0.00±0.00 ³ | 0.11±0.00 ⁴ |
| 20:3n-6 | 0.42±0.01 ² | 1.07±0.06 ³ | 0.88±0.06 ⁴ |
| 20:3n-9 | 0.09±0.00 ² | 4.46±0.43 ³ | 5.24±0.48 ³ |
| 20:4n-6 | 22.28±1.63 ² | 22.40±1.31 ² | 13.74±1.21 ³ |
| 22:4n-6 | 0.71±0.04 ² | 0.33±0.01 ³ | 0.24±0.02 ⁴ |
| 22:5n-3 | 0.44±0.05 ² | 0.17±0.03 ³ | 0.20±0.02 ³ |
| 22:6n-3 | 4.94±0.28 | 4.57±0.74 | 5.18±0.45 |
| Σ Polyunsaturated | 43.16±2.29 ² | 38.75±2.03 ² | 26.55±2.64 ³ |
| Total FA (μmol/G) | 216.43±15.90 ² | 152.04±5.99 ³ | 210.93±17.94 ² |

¹ X±SEM.^{2,3,4} Values without a common superscript are significantly different from others in the same row (P<0.05). Total fatty acid values are expressed in μmol/g liver.

Table 9.

EFFECT OF THE DIETS ON HEPATIC PEROXISOMAL DENSITY, PROTEIN CONTENT, THE PALMITOYL-CoA OXIDATION AND THE CATALASE CAPACITY IN THE LIVER¹

| | C (8) | OX (12) | EFAD (8) |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| DENSITY (g · ml ⁻¹) | 1.2264±0.0007 ² | 1.2399±0.0009 ³ | 1.2271±0.0010 ² |
| PROTEIN (µg · g liver ⁻¹) | 93.3±6.9 ² | 396.5±35.9 ³ | 118.1±11.2 ² |
| PALMITOYL-CoA OXIDATION (nmol NADPH · min ⁻¹ · g liver ⁻¹) | 9.1±1.3 ² | 63.7±5.1 ³ | 11.2±0.8 ² |
| CATALASE (µmol · min ⁻¹ · g liver ⁻¹) | 2.1±0.2 ² | 5.1±0.4 ³ | 2.8±0.3 ² |
| RATIO ⁴ | 4.5±0.4 ² | 13.7±1.1 ³ | 4.3±0.4 ² |

¹ X±SEM.

^{2,3} Values without a common superscript are significantly different from others in the same row (P<0.05). A light mitochondrial fraction from rat liver was fractionated by Nycodenz density gradient centrifugation and the peroxisomal fraction was assayed for density, protein content and marker enzymes.

⁴ Ratio of activities was expressed as (palmitoyl-CoA oxidase (nmol NADPH·min⁻¹·g liver⁻¹)/ catalase (µmol·min⁻¹·g liver⁻¹)) 1000.

TROISIÈME PARTIE

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES D'AVENIR

CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE

Discussion

Les trois publications qui font l'objet de cette thèse ont comme fil conducteur la déficience en acides gras essentiels. Elles confirment nos travaux montrant que son incidence est très élevée dans la FKP, tout particulièrement chez ceux qui ont une atteinte hépato-biliaire. Ces études nous ont donné l'occasion de faire les observations suivantes:

La déficience en acides gras essentiels pourrait être en partie expliquée par le stress oxydatif qu'on observe dans la FKP malgré de généreux suppléments de vitamine E. Etant donné que l'administration de β -carotène corrige le déséquilibre entre les prooxydants et les antioxydants, il semblerait que le β -carotène, en vertu de sa plus grande liposolubilité et de sa plus grande efficacité antioxydante à basse tension d'oxygène, agisse en synergie avec la vitamine E sans toutefois modifier la déficience en AGE.

Les patients avec atteinte hépato-biliaire sont plus vulnérables à la déficience en acide gras essentiel. Le redressement de leur fonction hépato-biliaire, par l'acide ursodéoxycholique, entraîne une amélioration concomitante du statut des acides gras essentiels et en particulier de l'acide arachidonique, acide gras essentiel qui joue un rôle capital sur la croissance.

Finalement, une étude à volet expérimental a démontré que les lipoperoxydes d'origine exogène entraînent des modifications structurales et fonctionnelles des peroxysomes. Nos observations cliniques et expérimentales initiales suggéraient que la lipoperoxydation endogène, et/ou la déficience en acides gras essentiels, entraînait(ent) une dysfonction peroxysomiale caractérisée par une augmentation des acides gras à chaîne très longue (\geq C24:0) et par une diminution des plasmalogènes. Or, notre travail expérimental chez l'animal montre que la déficience en acides gras essentiels en soi n'a pas d'effet sur la fonction peroxysomiale. Par contre les lipoperoxydes exogènes modifient la structure des peroxysomes (augmentation de

leur densité) et augmentent de façon importante leur capacité de β -oxydation ainsi que leur activité antioxydante (catalase).

Tout au cours de cette thèse, nous avons porté un soin particulier aux méthodes d'analyses employées. La spécificité et la reproductibilité des résultats en dépendent. Nous avons mis au point la méthode de détermination des acides gras par chromatographie gazeuse il y a déjà plus de dix ans (305). Ne comportant aucune étape d'extraction des lipides préalable à l'analyse des AG par chromatographie gazeuse, cette méthode est beaucoup plus précise que celles utilisées par d'autres équipes (306,307). La recouvrance des AG est meilleure, parce qu'ils sont extraits tout au cours de la réaction de 1 heure à 100°C, plutôt que pendant quelques minutes à la température de la pièce (305). De plus, les AG à chaîne moyenne et les AG polyinsaturés sont recouverts à près de 100%. Ces deux classes d'AG ont habituellement une faible récupération, car ils sont perdus lors de l'évaporation du solvant d'extraction étant donné leur grande volatilité après méthylation. Notre méthode ne comporte aucune perte d'AG puisqu'il n'y a pas d'évaporation du solvant préalable à l'analyse par GLC. Enfin, l'addition d'un standard interne, l'acide tridécanoïque, assure une grande reproductibilité des résultats. Au cours de cette thèse, les AG du plasma, du foie, du cœur, du cerveau, des fécès, des membranes, des peroxysomes et des diètes ont été analysés par cette technique de transestérification directe (305). Après séparation des phospholipides par chromatographie sur couche mince, le silica a été gratté et la transestérification fut effectuée directement, sans extraction préalable. Cette technique a donné une meilleure recouvrance et reproductibilité. Notre méthode est aujourd'hui employée par de nombreuses équipes en lipidologie (28,237,308-310).

Le malondialdéhyde est un important marqueur biologique de peroxydation lipidique. C'est un produit terminal de l'oxydation et de la décomposition des acides gras polyinsaturés qui contiennent 3 doubles liens ou plus. C'est aussi un produit endogène issu de la biosynthèse des prostaglandines et des leukotriènes (311). De toutes les techniques disponibles pour mesurer le malondialdéhyde, la plus populaire est celle qui mesure par spectrophotométrie les substances ayant réagi avec le TBA

(72). L'acide thiobarbiturique se lie au malondialdéhyde qui représente 15% des produits de peroxydation lipidique. La technique de mesure du malondialdéhyde manque de spécificité et de nombreuses améliorations ont été apportées depuis que Sinnhuber et Yu l'ont décrite (312). La technique par HPLC que nous avons utilisée dans cette étude est très spécifique et reproductible, parce qu'elle ne mesure que le complexe MDA-TBA (313).

La mise au point d'une méthode précise pour l'analyse du malondialdéhyde a nécessité plus d'un an de travail. La peroxydation des lipides est constante *in vivo*, mais ne donne naissance qu'à 70 nmoles/L de MDA pour une concentration plasmatique d'environ 10 mmoles/L d'acides gras (tableau 2-2). Donc une seule molécule d'AG sur 150,000 est oxydée et se transforme en MDA. La méthode utilisée doit être très sensible pour détecter un signal aussi faible. Les méthodes existantes sont utiles pour mesurer la peroxydation produite *in vitro*, lorsqu'un peroxydant tel le fer est ajouté à des tissus. Elles sont par contre insatisfaisantes pour la mesure des concentrations circulantes *in vivo*. Le MDA est une molécule de petit poids moléculaire qui n'absorbe pas la lumière et ne peut donc être mesuré par spectrophotométrie. C'est pourquoi l'acide thiobarbiturique (TBA) doit préalablement être complexé au MDA. Le TBA est ensuite mesuré par spectrophotométrie à 532 nm ou par fluorescence. Par contre, le TBA n'est pas spécifique au MDA. Il se complexé à différentes molécules telle la bilirubine, souvent élevée chez nos patients FKP (appendice 1). Même le standard de tétraéthoxypropane, utilisé pour la production de la courbe standard MDA, donne naissance à 13 différents polymères, qui produisent tous des pics d'absorption (314). Ces molécules formant un complexe avec le TBA doivent être préalablement séparées par HPLC avant de pouvoir mesurer le MDA-TBA de façon spécifique. De plus, une quantité adéquate d'hydroxytoluène de butylate doit être ajoutée à la réaction afin d'inhiber toute production de malondialdéhyde naissant de la peroxydation d'acides gras polyinsaturés durant la réaction. Cette technique que nous avons publiée en 1991 (313), s'est avérée très sensible, spécifique et reproductible pour la détermination du MDA dans les diètes (chapitre 4), le plasma (tableaux 2-2 et 3-4) et le foie (tableau 3-4).

La méthode utilisée pour la détermination des vitamines antioxydantes liposolubles représente un progrès sensible sur plusieurs techniques telles que décrites aux chapitres 2 et 3. L'ajout d'acide ascorbique a permis l'inhibition de l'oxydation de la vitamine E durant la préparation des échantillons. L'addition d'acétate de tocophérol comme standard interne a amélioré de beaucoup la reproductibilité des déterminations par HPLC sur le plasma (tableaux 2-3 et 3-5 et 4-5), le foie (tableau 4-5) et les diètes (chapitre 4). L'utilisation d'un détecteur photodiode à longueur d'onde variable (190-600 nm) avec une capacité de 10 spectres par seconde, nous a permis de maximiser la sensibilité pour chacune des vitamines analysées. L'utilisation d'un mélange isocratique de 4 solvants a rendu possible la détermination des esters du rétinol dans le plasma et le foie. Cette mesure s'est avérée très importante au cours de nos études parce que les patients FKP ont des taux anormaux d'esters du rétinol (tableaux 2-3 et 3-5) et parce que le rétinol est totalement estérifié dans le foie (tableau 4-5).

La méthode utilisée pour la séparation des peroxysomes hépatiques a nécessité un voyage de quelques jours à Pittsburgh, Pennsylvanie, dans le laboratoire des docteurs Gail Sekas et Harry Paul, spécialistes dans ce domaine (315). Comme toute séparation d'organite cellulaire, cette technique demande beaucoup de minutie et de pratique. Premièrement, le piston du potter-elvehjem utilisé a préalablement dû être tourné par un machiniste, afin de dégager un espace de 300 μm entre le piston et le potter. Ceci a permis de bien homogénéiser les morceaux de foie sans détruire les peroxysomes, organite cellulaire de 550 nm de diamètre (233). Deuxièmement, l'utilisation d'un appareil Gradient Master de BioComp Instruments, Inc. a permis une reproductibilité exceptionnelle dans la linéarité des gradients de Nycodenz. Les résultats en font foi avec des erreurs types très faibles pour les densités des peroxysomes (tableau 4-9).

La déficience en AGE est une manifestation connue chez les patients FKP (12,316-323). Nous avons démontré que près de 50% des enfants FKP suivis à la clinique de l'Hôpital Sainte-Justine sont biochimiquement déficients en AGE (12) et que la constitution de leurs lipoprotéines plasmatiques est anormale (324). Une

restriction des apports lipidiques, leur malabsorption, une peroxydation accrue, un métabolisme anormal, ont été mis en cause (321,325). Une publication de Corey et collaborateurs en 1988 a démontré que les patients FKP du Children's Medical Center à Boston avaient une survie de 21 ans comparativement à 30 ans pour ceux du Hospital for Sick Children à Toronto (326). Comme les protocoles de traitement étaient identiques dans les deux institutions, si ce n'est pour la consommation de lipides qui était restreinte à Boston, on a suggéré que la restriction des lipides de la diète était responsable de cette différence (327). Dans deux autres publications, il a été noté que l'espérance de vie est plus grande chez les patients dont la stéatorrhée est moindre (328) et que leur fonction pulmonaire est meilleure (214).

Comme la peroxydation lipidique peut entraîner une déficience en AGE, il nous est apparu important d'étudier la possibilité que la correction du déséquilibre entre les pro et les antioxydants puisse avoir un effet sur la déficience en AGE. Etant donné que les patients FKP ont des concentrations élevées de MDA et, ceci, malgré des niveaux plasmatiques normaux de vitamine E, une étude a été mise en route afin de tester l'hypothèse voulant que des suppléments de β -carotène pourraient diminuer la peroxydation lipidique compte tenu du fait que le plasma des enfants FKP est à peu près dépourvu de cet antioxydant. Notre première étude confirme les résultats des études précédentes qui rapportent des signes de peroxydation lipidique et de faibles taux de β -carotène chez les patients FKP (49,329-340). Les taux élevés de MDA, malgré une concentration normale de vitamine E, suggèrent qu'il existe une relation entre la peroxydation lipidique et les niveaux de β -carotène chez les patients FKP. Il existe en fait une corrélation inverse entre les concentrations plasmatiques de MDA et celles du β -carotène (figure 2-3). Ce résultat est appuyé par une diminution des niveaux de MDA, suite à la supplémentation en β -carotène dans la seconde partie de l'étude (figure 2-2).

Tous les patients qui ont participé à cette étude, recevaient une supplémentation en vitamine E. Parce que le β -carotène est une pro-vitamine liposoluble, de nombreux auteurs ont conclu que les concentrations à peine mesurables chez les patients FKP sont en rapport avec la malabsorption des lipides

(341). Deux études ont cependant démontré qu'il existe une meilleure corrélation avec la sévérité de l'infection pulmonaire, qu'avec le degré de malabsorption (232,329). Les différences dans les concentrations plasmatiques de β -carotène retrouvées entre les patients FKP et les témoins pourraient aussi être expliquées par un catabolisme rapide des caroténoïdes. En effet ceux-ci vraisemblablement servent à trapper les radicaux libres générés par l'inflammation chronique chez ces patients (329). Le β -carotène a la capacité de trapper les radicaux libres de dioxyde d'azote (NO_2), de thiyl ($\text{RS}\cdot$) et de sulfonyl ($\text{RSO}_2\cdot$) (99). Il peut aussi prévenir la peroxydation des AG polyinsaturés par un oxygène singulet (342). Les LDL de patients déplétés en β -carotène produisent de grandes quantités d'aldéhyde lorsqu'on soumet ces LDL à la peroxydation (343).

L'augmentation du stress oxydatif est la résultante d'un déséquilibre entre les espèces prooxydantes et antioxydantes en faveur de l'état prooxydant. En effet, la production de radicaux libres est normale *in vivo* en présence d'oxygène et d'acides gras polyinsaturés. La vitamine E est la vitamine antioxydante de première ligne. Nos résultats de l'appendice 1 nous montrent que les niveaux plasmatiques sont anormalement faibles chez les patients FKP déficients en AGE, malgré une supplémentation quotidienne. La malabsorption des lipides peut-elle en être tenue responsable? On sait que l'absorption des vitamines liposolubles est souvent déficiente chez ces patients (344), alors que celle des vitamines hydrosolubles est normale (108). La vitamine E a la capacité de diminuer la peroxydation lipidique des LDL des patients FKP (345). Leur fonction pulmonaire décroît avec l'âge et elle est associée à une diminution des taux plasmatiques des vitamines E et C (346-347). Les taux de malondialdéhyde que nous avons mesurés chez les patients FKP étaient anormalement élevés (Tableau 2-2). Nos résultats confirment les études montrant une peroxydation lipidique augmentée chez ces patients (348-349). Il semble que la peroxydation lipidique soit en partie responsable des dommages pulmonaires à cause de la sévérité de l'inflammation qui accompagne l'infection chronique chez ces patients (329). Les radicaux libres sont produits par les neutrophiles qui résultent de l'infection pulmonaire (49). On a retrouvé 1000 fois plus de neutrophiles dans le

liquide de lavage bronchoalvéolaire de patients FKP que dans celui des témoins (350). Il est reconnu, qu'une fois activés, les neutrophiles sont une source majeure de radicaux libres (338). De plus, certains produits sécrétés par le *Pseudomonas aeruginosa*, dont tous les patients sont chroniquement infectés, ont la capacité d'endommager les tissus par la génération de radicaux hydroxyl (338).

Le métabolisme accru de l'acide arachidonique au niveau des bronches peut aussi être responsable d'une grande production de radicaux libres (339). Le ralentissement de la progression de la maladie pulmonaire suite à la prise d'ibuprofen soutient cette hypothèse (340). Le gène CFTR, anormal chez les patients FKP, entraîne une augmentation secondaire de l'activité de la phospholipase A₂ induite par un taux élevé de Ca²⁺ intracellulaire (341). La peroxydation lipidique est probablement la conséquence d'un déséquilibre entre la génération accrue de radicaux libres et la disponibilité restreinte des mécanismes de défense antioxydants (334). Les antioxydants, aussi bien endogènes qu'exogènes, sont déficients chez les patients FKP. Les déficiences combinées d'antioxydants sont aussi plus communes chez les patients fibrose kystique du pancréas avec atteinte hépatique que chez ceux sans atteinte (334).

Il y a potentiellement deux sources majeures de radicaux libres chez les patients atteints de fibrose kystique du pancréas: ceux produits par le métabolisme de l'oxygène intracellulaire qui pourraient être en rapport avec le défaut primaire et ceux produits par les cellules inflammatoires qui accompagnent les infections pulmonaires aiguës et chroniques de la maladie (49). Les deux compartiments d'antioxydants, intra et extracellulaire, viennent en contact avec les radicaux libres produits par les neutrophiles activés dans les poumons de patients fibrose kystique du pancréas (348). Toutefois, il ne semble pas que des concentrations adéquates d' α -tocophérol soient suffisantes pour enrayer la peroxydation lipidique. En effet, pour des concentrations données d' α -tocophérol plasmatique ou de globules rouges, les érythrocytes de patients atteints de fibrose kystique du pancréas sont plus susceptibles à l'hémolyse induite par la peroxydation que ceux des témoins (351) et

suggère qu'un supplément de β -carotène devrait faire partie du traitement de tous les patients avec FKP.

La baisse de MDA mesurée chez nos patients FKP après supplémentation avec du β -carotène appuie notre hypothèse voulant que le β -carotène agisse comme antioxydant en synergie avec la vitamine E (Figure 2-2). De plus, nous avons noté une relation inverse entre les concentrations plasmatiques de malondialdéhyde et de β -carotène (figure 2-3). Ces résultats ont d'ailleurs été observés par une autre équipe dernièrement (352).

Tel qu'écrit plus haut, une étude portant sur 163 patients de l'Hôpital Ste-Justine, a montré que la déficience en AGE était présente chez 47% des patients (12). Deux hypothèses ont été avancées afin d'expliquer cette déficience: la malabsorption des lipides et un défaut métabolique des acides gras essentiels possiblement en rapport avec la mutation responsable de la maladie. En effet, nous avons noté que la stéatorrhée était deux fois plus importante chez les patients déficients en acides gras essentiels que chez le groupe dont le statut en acides gras essentiels était normal (appendice 1). Toutefois, la possibilité d'un défaut métabolique des acides gras essentiels a reçu certains appuis face à l'échec de la plupart des interventions diététiques dont le but était de corriger cette déficience (318,322,353,354) et aux observations suggérant que l'augmentation des prostaglandines pourrait contribuer à la déficience en AGE. Dans ce contexte, il nous a paru logique de proposer que la déficience en AGE pourrait être en partie attribuable à la perte des acides gras essentiels suite à leur peroxydation.

Les acides gras polyinsaturés, qu'ils soient libres ou incorporés aux membranes des lipides, peuvent facilement être attaqués par les radicaux libres et être ainsi perdus. Cependant, les résultats obtenus ne supportent pas ce mécanisme, car nous n'avons pu trouver de corrélation entre les niveaux de malondialdéhyde (figure 2-2) et ceux du marqueur de la déficience en acides gras essentiels, le ratio 20:3n-9/20:4n-6 (tableau 2-4). De plus, le statut des acides gras essentiels ne s'est pas amélioré suite à la supplémentation en β -carotène (tableau 2-4). Cependant, les

patients dont la concentration de malondialdéhyde a le plus chuté, sont ceux dont la stéatorrhée était la plus importante. Comme il s'agissait d'une étude à court terme, il reste à savoir si une supplémentation en β -carotène de plus longue durée aurait pu améliorer le statut des acides gras essentiels chez ces patients.

Les caroténoïdes, et le β -carotène en particulier, ont reçu beaucoup d'attention comme antioxydants exogènes au cours des deux dernières années. Le β -carotène prévient la peroxydation des acides gras polyinsaturés, sous l'attaque d'un oxygène singulet ou de radicaux libres (342,355). Il peut de plus trapper les oxydes d'azote et les peroxydinitrites, tous deux très toxiques pour la cellule (96). La production d'hexanal, de pentanal et de pentane par des LDL oxydés par le cuivre a été rapportée comme étant plus marquée chez des patients déplétés en β -carotène et diminuée par la supplémentation (343). Il n'y a pas que le β -carotène dans les caroténoïdes qui a la capacité d'inhiber la peroxydation des LDL; la canthaxanthine et la zeaxanthine ont aussi cette propriété (93). L'activité de la superoxyde dismutase qui était faible chez des patients s'est normalisée au même titre que le malondialdéhyde à la suite d'une supplémentation en β -carotène (343). Ceci suppose que le β -carotène pourrait agir comme trappeur de radicaux superoxydes. L'inflammation pulmonaire dans la FKP est associée à une relâche augmentée d'oxydants et de protéinases par les neutrophiles. Lors d'une étude chez des patients FKP, l'antiprotéinase α , marqueur d'inflammation pulmonaire, a diminué après supplémentation en β -carotène (356). Il semble de plus que la supplémentation en β -carotène améliore certains indices de la réponse immunitaire chez les patients malades (357,358).

Lorsqu'administré avec l' α -tocophérol, le β -carotène a montré non seulement des effets additifs (359) contre la peroxydation mais aussi une synergie (360,361). Une combinaison de β -carotène et d' α -tocophérol produit une inhibition de la peroxydation lipidique bien plus grande que la somme des contributions individuelles, lorsque des membranes microsomiales sont soumises à l'attaque des radicaux libres (362). Le β -carotène peut-il protéger la vitamine E de l'oxydation,

comme le fait la vitamine C en la régénérant? Deux mois de supplémentation en β -carotène n'ont pas permis d'augmenter significativement les concentrations plasmatiques de vitamine E, bien qu'une tendance ($p=0.16$) ait été observée (tableau 2-3). Une autre étude a montré une augmentation de la vitamine E plasmatique suite à la supplémentation de β -carotène pendant 16 mois (356). Des études de radiolyse à pulsion ont par contre démontré *in vitro* que le β -carotène, ni probablement aucun autre caroténoïde, n'a la capacité de régénérer l' α -tocophérol de sa forme oxydée (100). Il semble même qu'après que le β -carotène ait trappé un radical libre, ce nouveau complexe puisse oxyder la vitamine E, en formant un radical tocophéroxy.

Habituellement, la supplémentation en β -carotène n'a aucun effet sur les concentrations plasmatiques de rétinol libre ou estérifié. Bien que les concentrations de rétinol n'aient pas changé suite à la supplémentation de nos patients, nous avons noté une augmentation de 50% du taux plasmatique du rétinol estérifié au palmitate. Cette augmentation n'a pas été observée par d'autres chercheurs (352). Nous pensons que la raison est le manque de sensibilité de la technique qu'ils ont utilisée. La méthode d'analyse des formes estérifiées au rétinol que nous avons mise au point, mesure même les faibles concentrations chez tous les individus. Elle nous permet aussi de différencier les formes estérifiées aux acides palmitique, stéarique ou oléique. Le β -carotène est un précurseur métabolique de la vitamine A. Ayant utilisé du β -carotène marqué au ^{13}C lors d'une étude humaine, Parker et collaborateurs rapportent n'avoir mesuré que 14% de β -carotène dans le sang, alors que 64% était sous forme d'ester du rétinol et 21% avait été métabolisé en vitamine A par l'enzyme 15-15'-dioxygénase (363). Les mesures plasmatiques d'esters du rétinol sont considérées comme un bon marqueur d'accumulation hépatique du rétinol, parce qu'il existe une grande prévalence de fonctions hépatiques anormales chez les patients qui ont de hautes concentrations d'esters du rétinol (154). L'augmentation du palmitate de rétinol, mesurée chez nos patients, suite à la supplémentation de 2 mois en β -carotène, nous inquiéta quelque peu. Toutefois, le 7% observé est bien en deçà du 30% qui accompagne l'hypervitaminose A avec ses complications hépatiques (364). Les patients fibrose kystique du pancréas sont par contre sujets à l'hypervitaminose

A (365-366). Ils ont des réserves hépatiques d'esters du rétinol 3.5 fois plus grandes que la normale (367), bien que nous ayons mesuré un rétinol plasmatique anormalement bas. Les faibles concentrations de RBP, la protéine transporteuse, en sont responsables (364). Nous croyons donc que les suppléments de β -carotène utilisés sont sans danger, à condition que les concentrations plasmatiques de rétinol estérifié soient régulièrement vérifiées.

Nous avons noté lors d'une étude pilote que les patients les plus déficients en acides gras essentiels n'étaient pas nécessairement les plus dénutris, mais étaient plutôt ceux dont les fonctions hépatiques étaient altérées (appendice 1). Dans trois études pédiatriques, la supplémentation en acide ursodéoxycholique a permis d'améliorer les épreuves de fonction hépatique, peu importe la sévérité de la maladie hépatique (176-178). Les résultats de notre deuxième étude, dans laquelle 19 patients FKP avec déficience en AGE et atteinte hépato-biliaire recevaient de l'acide ursodéoxycholique, confirment ceux qui ont déjà été rapportés par d'autres (179-181). Nous avons observé une baisse substantielle de la concentration du cholestérol plasmatique chez ces patients fibrose kystique avec atteinte hépatique suite à la prise quotidienne d'acide ursodéoxycholique (tableau 3-3). Cette observation a déjà été rapportée par d'autres chez des patients avec cirrhose biliaire primaire (179,368) et chez des témoins (369). Nous avons aussi trouvé une diminution de la concentration des triglycérides plasmatiques (tableau 3-3), ce qui confirme les résultats d'une autre étude faite chez des patients FKP d'âge pédiatrique (370). L'effet de réduction du cholestérol et des triglycérides par l'acide ursodéoxycholique, semble être causé par un changement de leur métabolisme. L'acide ursodéoxycholique peut avoir altéré la concentration du cholestérol plasmatique en diminuant sa synthèse ou son absorption intestinale, en augmentant son extraction du plasma par le foie ou encore en augmentant sa conversion en acides biliaires. On a rapporté une diminution de 3 fois l'activité de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A reductase, après supplémentation d'un an avec l'acide ursodéoxycholique (371). Cet acide biliaire peut aussi réduire la sécrétion biliaire du cholestérol (371). Une augmentation importante du cholestérol observé dans les selles de patients sous acide

ursodéoxycholique, a été attribué à une diminution de la capacité de l'iléon d'absorber le cholestérol (372). L'acide ursodéoxycholique peut aussi avoir augmenté l'extraction du cholestérol plasmatique par son effet sur les récepteurs des LDL. En effet, il fut démontré que cet acide biliaire augmentait la capacité d'extraction des récepteurs dans des hépatocytes isolés de hamster (373) ainsi que chez des patients traités pour cholélithiase (374). Il n'est pas clair si l'acide ursodéoxycholique augmente la conversion du cholestérol vers les acides biliaires, parce que différentes études ont donné des résultats contradictoires, augmentant, diminuant ou laissant inchangé le pool des acides biliaires suite à la prise d'acide ursodéoxycholique (372,375,376).

La malnutrition est une manifestation fréquente de la FKP et elle est étroitement reliée à la survie (377). La déficience en AGE constitue avec la déficience en β -carotène la déficience nutritionnelle spécifique la plus fréquente. Les patients avec une atteinte hépato-biliaire sont plus vulnérables (appendice 1). Les résultats de notre étude avec l'acide ursodéoxycholique démontrent que la supplémentation avec cet acide biliaire cholérétique a conduit à une augmentation des acides gras de la famille $n-6$ et à la réduction du marqueur de la déficience en acides gras essentiels, le ratio $20:3n-9/20:4n-6$ (tableau 3-4). On sait que l'AUDC ne forme pas de micelles avec les produits de la lipolyse (173). Donc, il est peu probable que l'amélioration du profil des acides gras essentiels soit en rapport avec une absorption plus complète des lipides. De plus, aucune amélioration de la stéatorrhée n'a été rapportée suite à la prise d'AUDC (370,378). Plus probable est la possibilité que l'AUDC modifie le métabolisme des acides gras, d'autant qu'une étude effectuée chez des nourrissons souffrant d'atrésie des voies biliaires a montré une amélioration du statut de l'acide linoléique suite à un traitement à l'AUDC (176). L'hypothèse voulant que l'AUDC modifie le métabolisme des AGE est aussi renforcée par nos résultats sur les triglycérides et les esters du rétinol. Ceci suggère que l'acide ursodéoxycholique peut modifier l'homéostasie du cholestérol, des triglycérides, ainsi que le métabolisme des acides gras essentiels. Des études *in vitro*, faites sur les enzymes des microsomes responsables de la désaturation des acides

gras, montrent que les activités de la $\Delta 6$ -désaturase qui convertit le $18:2n-6$ en $18:3n-6$ et de la $\Delta 5$ -désaturase qui convertit le $20:3n-6$ en $20:4n-6$, sont tous deux diminués chez des rats avec stéatose hépatique (379). Ceci est en accord avec la protection offerte par le $18:3n-6$ (380) et le $20:4n-6$ (381) contre la stéatose hépatique chez le rat. La stéatose hépatique est fréquente chez la fibrose kystique du pancréas (218). Il reste à prouver si l'acide ursodéoxycholique augmente directement l'activité enzymatique responsable de la désaturation des acides gras essentiels ou si les changements observés dans le métabolisme de ceux-ci sont la résultante de la diminution de la cytolysse, documentée par l'amélioration des transaminases hépatiques (tableau 3-2). Jusqu'à tout récemment, les effets bénéfiques de l'UDCA sur le foie se limitaient à une amélioration des épreuves de fonction hépatique. Toutefois, une étude a mis en évidence des changements histologiques favorables (382). Ceci reste à confirmer. Il est justifié de songer à la possibilité que la diminution du processus inflammatoire au foie pourrait enrayer la production de radicaux libres, donc avoir un effet bénéfique sur le statut des AGE.

Les patients atteints de fibrose kystique du pancréas qui ne reçoivent pas de supplément de vitamines liposolubles développent rarement une déficience en vitamines D ou K, mais près de 50% d'entre eux ont des signes biochimiques de déficience en vitamine A et E (344). L'absorption du rétinol, qui comporte beaucoup de similarité avec celle des triglycérides, a déjà été utilisée comme analyse de dépistage de la malabsorption des lipides chez la fibrose kystique du pancréas (383). La vitamine A est ingérée sous forme d'esters du rétinol ou de β -carotène. Le rétinol est hydrolysé dans l'intestin et est absorbé sous forme de rétinol libre, alors que le β -carotène est absorbé tel quel et se convertit en rétinol dans la muqueuse intestinale (131). La plus grande partie de la vitamine A absorbée par le foie entre dans la circulation par voie lymphatique sous forme d'esters du rétinol, transportés par les chylomicrons. Les résidus de chylomicrons sont formés sous l'action de la lipase lipoprotéinique (384). Ces particules, incluant les esters du rétinol, sont alors captés par les récepteurs de LDL à la surface des hépatocytes (132). La réduction des concentrations plasmatiques des esters du rétinol et des triglycérides suggère que

l'acide ursodéoxycholique augmente la captation des résidus de chylomicrons par le foie.

Habituellement, les concentrations plasmatiques de rétinol et de la protéine liant le rétinol, le RBP, reflètent les niveaux des réserves hépatiques. Toutefois, la plupart des patients FKP ont des concentrations plasmatiques faibles de rétinol et de RBP, malgré des niveaux hépatiques élevés de vitamine A (367). Ceci suggère un problème dans la sortie hépatique du rétinol (385). Il est connu que les patients FKP supplémentés en vitamine A, ont des réserves hépatiques 3.5 fois plus grandes que les témoins (367). Les patients FKP de notre étude avaient des concentrations plasmatiques de rétinol faibles, malgré une supplémentation depuis des années (tableau 3-5). Une étude suggère que les infections pulmonaires chroniques diminuent la concentration plasmatique de vitamine A durant les périodes d'exacerbation (386). Nous avons démontré qu'il existait une excellente corrélation entre les faibles niveaux de rétinol, de RBP et de transthyrétine (tableau 3-5), corroborant ainsi l'étude de Smith et collaborateurs (387). Les taux circulants d'ester du rétinol étaient élevés (tableau 2-5), sans toutefois atteindre ceux observés dans les cas d'hypervitaminose A (364). Nous avons observé une excellente corrélation ($r=0.88$) entre les taux élevés d'esters du rétinol et les transaminases hépatiques au début de l'étude. Cette corrélation n'existait plus après supplémentation à l'acide ursodéoxycholique. L'amélioration de la fonction hépatique s'est accompagnée d'une baisse de 48.8% des esters du rétinol circulants, ce qui suggère que l'amélioration de la fonction hépatique aurait pu contribuer à cette réduction. Ces résultats suggèrent qu'une attention particulière devrait être apportée aux concentrations plasmatiques de RBP, de rétinol et d'esters du rétinol chez les patients FKP supplémentés en vitamine A, à cause de son potentiel hépatotoxique (388). Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que les perturbations documentées dans le métabolisme des lipides, des acides gras essentiels, du rétinol et de la fonction hépatique, pourraient être interreliées. Les mécanismes par lesquels l'acide ursodéoxycholique altère le métabolisme des lipides, des acides gras essentiels et du rétinol peuvent être multifactoriels et ne sont pas compris à ce jour. La compréhension de ces mécanismes pourrait avoir des implications cliniques considérables.

Tel que décrit plus haut, lors d'une étude de dépistage de la déficience en AGE chez des enfants souffrant de FKP, nous avons mesuré par chromatographie gazeuse des concentrations plasmatiques anormales d'AG à chaîne très longue. Nous avons remarqué en effet qu'un certain nombre d'entre eux présentaient un profil lipidique plasmatique caractérisé par une augmentation du ratio C24:0/C22:0 et une diminution du ratio C18:0 DMA/C18:0 (appendice 2), suggérant une perturbation du métabolisme des AG à chaîne très longue et des plasmalogènes qui est dépendant des peroxysomes (261). Nous avons remarqué que seuls les patients atteints d'une déficience en AGE présentaient ces anomalies biochimiques. Cette observation suggérait que la déficience en AGE entraîne une dysfonction peroxysomiale. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons créé un modèle animal de déficience en AGE (appendice 3). Comme chez les patients FKP déficients en AGE, les rats déficients en AGE présentaient un ratio C24:0/C22:0 augmenté et un ratio C18:0 DMA/C18:0 diminué (appendice 4). Ceci nous permettait donc de supposer que la dysfonction peroxysomiale observée dans la FKP est causée par la déficience en AGE et n'est probablement pas en rapport avec le génome du CFTR mutant. D'autre part, la déficience en plasmalogènes était aussi d'intérêt puisqu'un des rôles physiologiques proposés est la protection contre le stress oxydatif. En effet, les cellules qui en sont dépourvues par mutation génétique montrent une hypersensibilité aux oxydants (389). Désirant explorer qui, de la déficience en AGE ou du stress oxydatif, est responsable de la dysfonction peroxysomiale, un modèle animal a été créé. Au cours de cette troisième étude, il a été possible d'étudier à la fois la déficience pure en AGE et la déficience associée à un stress oxydatif secondaire à l'ingestion de lipoperoxydes diététiques.

L'auto-oxydation des lipides polyinsaturés que contiennent les graisses et de la nourriture, ainsi que la dégradation des lipides des membranes suite à leur peroxydation, donnent naissance à des mélanges complexes d'hydroperoxydes lipidiques et à des polymères (390). Les résultats de notre étude montrent que 97% des acides gras polyinsaturés de la diète OX ont été perdus, suite à une exposition à l'air ambiant pendant 10 semaines (tableau 4-2). Les produits issus de l'auto-oxydation des acides gras polyinsaturés peuvent être absorbés chez le rat et

s'accumulent au foie (391), alors que l'huile oxydée en la chauffant donne naissance à des polymères non absorbables de poids moléculaire plus grand (392). Dans la présente étude, l'absorption de lipides oxydés entraîna de la diarrhée, une perte de poids et des signes biochimiques de déficience en AGE et de peroxydation lipidique, associée à une perte des vitamines liposolubles antioxydantes. En réponse au stress oxydatif causé par l'ingestion de lipoperoxydes par un organisme déplété en vitamines antioxydantes, on a noté une augmentation importante de l'activité de la palmitoyl CoA oxydase responsable de la β -oxydation des AG à chaîne très longue, ainsi que de la catalase dans une préparation de peroxysomes hépatiques.

Même si les huiles oxydées ne sont généralement pas considérées comme très toxiques, leur supplémentation chronique produit une perte d'appétit, la diarrhée et un retard de croissance (66). La diarrhée peut être secondaire à une prolifération bactérienne du petit intestin (393) ou de nature sécrétoire suite à l'inflammation de la muqueuse intestinale. Les métabolites de l'oxygène et de l'azote, produits pendant l'oxydation et les réactions avec des radicaux libres, produisent une diarrhée alors qu'ils agissent comme des secrétagogues (394). Le stress oxydatif que crée la déficience en vitamine E chez le rat, apporte des changements des composantes statiques et dynamiques de la fluidité membranaire du petit intestin (395). La diarrhée retrouvée dans notre groupe de rats OX, ayant absorbé des AG oxydés, confirme ces données (tableau 4-3). Nous avons aussi noté une légère hépatomégalie chez ces animaux (tableau 4-3). Ces résultats ont aussi été trouvés par d'autres (66,392). Il semble que les aldéhydes absorbés soient toxiques pour le foie, augmentent la mesure des enzymes hépatiques et entraînent l'hépatomégalie (392). Nous n'avons pas trouvé d'augmentation du poids des foies des rats déficients en AGE (tableau 4-3), contrairement à d'autres études (396). Il est connu que les AG des familles *n*-6 et *n*-3 inhibent la synthèse hépatique des triglycérides et que la déficience en AGE crée la stéatose hépatique et l'hépatomégalie en ne pouvant inhiber la lipogénèse (397). Même si les triglycérides plasmatiques étaient augmentés chez les rats déficients en AGE (tableau 4-6), il n'y avait aucun signe de stéatose histologique ou biochimique. Le niveau plus faible de déficience en AGE

(0.432 ± 0.024) tel que mesuré par le ratio ratio 20:3n-9/20:4n-6, comparativement à une étude antérieure (1.410 ± 0.415) semble expliquer ces résultats (398).

La rancidité créée par l'oxydation des acides gras polyinsaturés, diminue la qualité des aliments. Les peroxydes lipidiques et les radicaux libres produits détruisent les vitamines liposolubles et réagissent avec les liens sulphydryls des protéines. En réponse à l'administration de lipides oxydés et à la déplétion des vitamines antioxydantes, de la vitamine E et du β -carotène (tableau 4-2), nous avons mis en évidence une élévation plasmatique et hépatique du malondialdéhyde, marqueur classique de peroxydation lipidique (400). Cette augmentation pourrait être secondaire à l'absorption du MDA contenu dans la diète, car les rats peuvent l'absorber (400,401). Une peroxydation endogène des lipides pourrait aussi être en cause (402). Les concentrations plasmatiques et hépatiques d' α -tocophérol et de β -carotène étaient nettement diminuées chez ces animaux (tableau 4-5) confirmant d'autres observations (403,404). Il y avait de plus une très forte corrélation négative entre le MDA plasmatique et les concentrations aussi bien plasmatiques qu'hépatiques de β -carotène, d' α - et de γ -tocophérol. Le γ -tocophérol a la capacité d'empêcher la formation d'hydroperoxydes lipidiques plus efficacement que l' α -tocophérol lorsque des liposomes sont exposés aux peroxydants (405). Contrairement aux humains chez qui les concentrations d' α -tocophérol sont 5 fois plus importantes que le γ -tocophérol, la concentration plasmatique de γ -tocophérol est 20 fois celle de la forme α chez le rat (tableau 4-5). Le fait que le plasma des rats, ayant mangé la diète oxydée, soit déplété en γ -tocophérol suggère un rôle d'antioxydant de ce dernier (tableau 4-5).

Les changements observés dans le profil lipidique plasmatique des animaux OX, soit une forte baisse du cholestérol et une baisse un peu plus modeste des triglycérides, ne peuvent être expliqués par la déficience en AGE, puisque les rats de ce groupe EFAD montrent plutôt l'augmentation attendue des triglycérides et aucun changement du cholestérol (tableau 4-6). On peut toutefois présumer qu'il y ait eu oxydation du cholestérol chez le groupe OX par les radicaux libres (406). Le ratio

20:3*n*-9/ 20:4*n*-6, marqueur de la déficience en AGE, n'était pas aussi élevé chez le groupe OX que pour le groupe EFAD. Le fait que les rats du groupe déficient en AGE ont reçu une diète déficiente en AGE pendant 12 semaines, alors que les AGE de la diète du groupe OX ont été progressivement oxydés par l'oxygène au cours de l'étude peuvent expliquer ces résultats. Les AGE, les acides linoléique et linoléique, de même que leurs métabolites, étaient plus bas dans le plasma et le foie des rats EFAD que OX (tableaux 4-7 et 4-8). Cependant, le 20:5*n*-3 et le 22:6*n*-3 font exception. On sait que ceux-ci ne sont pas peroxydés lors d'une déficience légère en AGE alors qu'ils sont plus vulnérables que les autres à la peroxydation (407). Ceci pourrait expliquer la forte corrélation négative trouvée entre le 22:6*n*-3 et les concentrations de malondialdéhyde.

L'augmentation par un facteur de 3.3 de l'activité de l'estérase, telle que mesurée dans la fraction enrichie de peroxyosomes des rats OX, suggère une contamination de ceux-ci par les microsomes. Ceci explique largement l'enrichissement en protéine de la fraction des peroxyosomes des rats OX (tableau 4-9). Les microsomes contiennent beaucoup plus de protéines que les peroxyosomes (315). Le fait que les microsomes soient très sensibles à la peroxydation (408) peut expliquer l'augmentation de leur densité, comme celle que nous avons mesurée dans les peroxyosomes de ce groupe de rats (tableau 4-9). A la lecture de ces données, nous avons choisi de rapporter les activités enzymatiques des peroxyosomes par gramme de foie. Comme l'activité de la glutamate déhydrogénase était minime et la même pour les trois groupes, nous pouvons conclure que les mitochondries n'ont pas contaminé les peroxyosomes et que l'augmentation de 600% de l'activité du palmitoyl-CoA oxydase est bien celle des peroxyosomes (tableau 4-9). A cause de leur configuration moléculaire, les lipides oxydés ne peuvent être transportés au travers du double feuillet membranaire des mitochondries afin de subir la β -oxydation (409). Ces observations suggèrent que les hydroperoxydes lipidiques, les peroxydes cycliques, les endoperoxydes cycliques, issus de la peroxydation des AG polyinsaturés sont dirigés vers les peroxyosomes cellulaires pour y être oxydés. Leurs produits pourront par la suite être acheminés vers la machinerie mitochondriale afin de fournir de

l'énergie. En règle générale, la prolifération des peroxysomes est induite par une surcharge ou une inhibition de l'activité mitochondriale. Or, les produits de la peroxydation lipidique peuvent diminuer l'activité des enzymes mitochondriales (402). Il semble de plus, que l'augmentation du malondialdéhyde active la synthèse du PPAR α mRNA, responsable de la prolifération des peroxysomes (410).

La catalase est l'enzyme clé responsable du métabolisme du H₂O₂ et sa localisation est peroxysomiale (79). L'augmentation de la catalase, que nous avons mesurée chez les animaux du groupe OX (tableau 4-9), était prévisible. Elle s'inscrivait comme étant secondaire à l'ingestion des peroxydes lipidiques (411) et pouvait aussi s'expliquer parce que la β -oxydation qui produit du H₂O₂ comme métabolite était augmentée (412). L'augmentation de la catalase était toutefois moindre que celle de la palmitoyl-CoA oxydase chez les rats OX (tableau 4-9). Ceci peut être dû au fait que la membrane du peroxysome est sélective. Elle laisse facilement s'échapper la catalase et la thiolase, alors que la palmitoyl-CoA oxydase ne peut diffuser aussi facilement à l'extérieur (413). Aussi, avons nous noté une augmentation par un facteur de 3 du ratio de la palmitoyl-CoA oxydase/catalase (tableau 4-9). Comme point de référence, notons que la prolifération des peroxysomes induite par le clofibrate augmente ce ratio de 5 fois (414), alors que l'acide eicosapentanoïque ne l'augmente que de 1.2 fois (415). Plus le ratio est élevé, plus le métabolisme cellulaire du H₂O₂ est débalancé.

Cette étude suggère que les lipoperoxydes exogènes s'ajoutent à la liste des substances qui induisent une prolifération des peroxysomes associée à une augmentation sélective de l'activité enzymatique (416). Contrairement aux produits, tels que le clofibrate et les herbicides, les lipoperoxydes entraînent une forte corrélation entre l'activité de la catalase et celle de la palmitoyl-CoA oxydase. Cette corrélation a déjà été rapportée dans une étude de supplémentation en huile de poisson (417). Il se peut que des lipoperoxydes aient été responsables de ces résultats, étant donné la forte tendance des AG de la famille *n*-3 à être peroxydés. Nos résultats sont en accord avec ceux d'une étude faite chez des rats soumis à une diète déficiente en vitamine A (418). Il est tentant de présumer que l'augmentation de

l'activité peroxysomiale puisse être secondaire à une augmentation des radicaux libres (419).

Ces résultats renforcent l'hypothèse voulant que les patients FKP sont soumis à un stress oxydatif augmenté, d'autant que des niveaux élevés de catalase et de superoxyde dismutase ont été documentés (420). Un cercle vicieux entre l'infection et l'inflammation s'établit. Les mécanismes normaux d'homéostasie ne peuvent briser le cycle. Une production soutenue de médiateurs inflammatoires stimule le recrutement de cellules inflammatoires additionnelles dont les produits sont responsables de bronchospasme et de l'augmentation des sécrétions qui exacerbent les anomalies pulmonaires sous-jacentes. Ce cercle vicieux des radicaux libres, des peroxydes et des infections semble être responsable de la détérioration pulmonaire progressive chez le patient FKP (49,334).

CHAPITRE 7

PERSPECTIVES D'AVENIR

Perspectives d'avenir

L'ensemble des études faites au cours des dernières années et résumées dans cette thèse ouvrent de vastes horizons. Celles-ci débouchent, en effet, sur de nouvelles stratégies d'interventions susceptibles de diminuer la morbidité de la FKP et d'améliorer la qualité de vie de ceux et celles qui en souffrent.

Le β -carotène, à peine mesurable dans la FKP, a un rôle important à jouer pour neutraliser le stress oxydatif qui persiste malgré les concentrations normales de vitamine E. Une étude au long cours devrait être faite non seulement pour confirmer ces résultats, mais aussi pour tester de façon plus définitive l'hypothèse voulant que le stress oxydatif contribue à la déficience en AGE.

La place de l'acide ursodéoxycholique dans le traitement des manifestations hépato-biliaires de la FKP est solidement établie. Comme dans plusieurs hépatopathies chroniques, telles que la cirrhose biliaire primitive et la cholangite sclérosante, il est clair que l'AUDC est un médicament d'appoint qui ralentit l'évolution de la maladie. Une étude devrait être entreprise avec l'AUDC aussitôt que le diagnostic de la maladie est fait pour voir si cette molécule aux propriétés cholérétiques, anti-inflammatoires et immuno-modulatrices pourrait prévenir l'atteinte hépato-biliaire et la déficience en AGE.

Compte tenu de la fréquence très élevée de la déficience en AGE dans la FKP et l'importance des acides gras essentiels pour la croissance et l'intégrité des membranes, ainsi que des défenses immunitaires, il y a lieu d'intervenir pour corriger cette déficience. Alertés aux nombreux échecs des tentatives de supplémentation (318,353,354), notre laboratoire est présentement impliqué dans des études animales et cliniques avec un complexe lipidique eutectique structuré (LYM-X-SORB) qui court-circuite totalement la phase lipolytique et micellaire. Des résultats préliminaires montrent que le LYM-X-SORB est dépourvu d'effets secondaires chez l'animal et entraîne une correction rapide de la déficience en AGE ainsi qu'une croissance staturo-pondérale inespérée chez les patients FKP. Une étude

multicentrique entreprise en bas âge sera nécessaire avant de conclure que cette approche aura un impact sur la qualité de vie, la morbidité et l'espérance de vie de ces enfants.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Holman RT. *Nutritional and metabolic interrelationships between fatty acids*. Fed Proc 1964;23:1062-1067.
2. Rawn JD. *Métabolisme des acides gras*. Dans: *Traité de Biochimie*, Ed. Du Renouveau Pédagogique Inc., De Boeck-Wesmael Press, Belgique, 1990;421-456.
3. Burr GO, Burr MM. *On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition*. J Biol Chem 1930;86:587-621.
4. Wildmer C, Holman RT. *Polyethenoid fatty acid metabolism. II. Deposition of polyunsaturated fatty acids in fat-deficient rats upon single fatty acid supplementation*. Arch Biochem Biophys 1950;25:1-12.
5. Holman RT. *Control of polyunsaturated acids in tissue lipids*. J Am Coll Nutr 1986;5:183-211.
6. Klenk E, Mohrhauer H. *Metabolism of polyene fatty acids in the rat*. Z Physiol Chem 1960;320:218-232.
7. de Alaniz MJT, de Gomez Dumm INT, Brenner RR. *Effect of different acids with $\Delta^9,12$ -dieic structures on Δ^9 desaturation activity in rat liver microsomes*. Lipids 1986;21:425-429.
8. Brenner RR. *Regulatory function of Δ^6 desaturase. Key enzyme of polyunsaturated fatty acid synthesis*. Adv Exp Biol 1977;83:85-101.
9. 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.
10. Holman RT. *Biological activities of and requirements for polyunsaturated acids*. Progr Chem Fats Other Lipids 1970;9:607-682.
11. Rivers JPW, Sinclair AJ, Crawford MA. *Inability of the cat to desaturate essential fatty acids*. Nature 1975;258:171-173.
12. Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L, Galéano 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.

13. Horrobin DF. *Fatty acid metabolism in health and disease: The role of Delta-6-desaturase*. Am J Clin Nutr 1993;57 Suppl.:732S-737S.
14. Feldman M, Van Aerde JE, Clandinin MT. *Lipid accretion in the fetus and newborn*. In: Polin RA, Fore WW, eds. Fetal and neonatal physiology, W.B. Saunders Co., 1992:299-314.
15. Koletzko B, Braun M. *Arachidonic acid and early human growth: is there a relation?* Ann Nutr Metab 1991;35:128-131.
16. Crawford MA. *The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition*. Am J Clin Nutr 1993;57 (Suppl):703S-710S.
17. Uauy RD, Birch EE, Birch DG, Peirano P. *Visual and brain function measurements in studies of n-3 fatty acid requirements of infants*. J Pediatr 1992;120:S168-S180.
18. Werkman SH, Carlson SE. *A randomized trial of visual attention of preterm infants fed docosahexaenoic acid until nine months*. Lipids 1996;31:91-97.
19. Spielmann D, Mendy F. *Nomenclature, synthèse et métabolisme des acides gras insaturés*. Nutr Clin Métabol 1993;7:3-18.
20. Merrill AH Jr, Schroeder JJ. *Lipid modulation of cell function*. Annu Rev Nutr 1993;13:539-559.
21. Spector AA, Yorek MA. *Membrane lipid composition and cellular function*. J Lipid Res 1985;26:1015-1035.
22. Stubbs CD, Smith AD. *The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function*. Biochim Biophys Acta 1984;779:89-137.
23. Brenner RR. *Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics*. Prog Lipid Res 1984;23:69-96.
24. Ghisolfi J. *Lipides, acides gras polyinsaturés et fonctions immunitaires*. Nutr Clin Métabol 1993;7:289-295.
25. Gyllenhammar H, Palmblad J, Ringertz B, Hafstrom I, Borgeat P. *Rat neutrophil function and leukotriene generation in essential fatty acid deficiency*. Lipids 1988;23:89-95.

26. Hartl WH, Wolfe RR. *The phospholipid/arachidonic acid second messenger system: its possible role in physiology and pathophysiology of metabolism.* JEPN 1990;14:416-427.
27. Sumida C, Graber R, Nunez E. *Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1993;48:117-122.
28. Dvorak B, Stepankova R. *Effects of dietary essential fatty acid deficiency on the development of the rat thymus and immune system.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1992;46:183-190.
29. Carpentier YA. *Actions immunomodulatrices des lipides.* Nutr Clin Métab 1996;10:97-105.
30. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JWM, Cannon JG, Rogers TS, Klempner MS, Weber PC, Schaefer EJ, Wolff SM, Dinarello CA. *The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells.* N Engl J Med 1989;320:265-271.
31. Kinsella JE, Lokesh B, Broughton S, Whelan J. *Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview.* Nutrition 1990;6:24-44.
32. Ong PY. *The mechanisms for the effects of dietary lipid modification on autoimmune diseases: the role of membrane lipid composition in antigen presenting cells.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1992;47:327-329.
33. Mlakar A, Spiteller G. *Distinction between enzymic and nonenzymic lipid peroxidation.* J Chromatogr A 1996;743:293-300.
34. Traber MG, Packer L. *Vitamin E: Beyond antioxidant function.* Am J Clin Nutr 1995;62:1501S-1509S.
35. Zimmerman JJ. *Oxyradical pathophysiology.* Adv Pediatr 1996;42:243-302.
36. Kelly FJ. *Free radical disorders of preterm infants.* Br Med Bull 1993;49:668-678.
37. Poli G. *Liver damage due to free radicals.* Br Med Bull 1993;49:604-620.

38. Van Ginkel G, Sevanian A. *Lipid peroxidation-induced membrane structural alterations*. Methods Enzymol 1994;233:273-288.
39. Racay P, Kaplán P, Mézesová V, Lehotsky J. *Lipid peroxidation both inhibits Ca^{2+} -ATPase and increases Ca^{2+} permeability of endoplasmic reticulum membrane*. Biochem Mol Biol Int 1997;41:647-655.
40. Cao EH, Liu XQ, Wang LG, Wang JJ, Xu NF. *Evidence that lipid peroxidation products bind to DNA in liver cells*. Biochim. Biophys Acta Lipids Lipid Metab 1995;1259:187-191.
41. Yang MH, Schaich KM. *Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes*. Free Radic Biol Med 1996;20:225-236.
42. Gutteridge JMC. *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. Clin Chem 1995;41:1819-1828.
43. Halliwell B. *Antioxidant characterization. Methodology and mechanism*. Biochem Pharmacol 1995;49:1341-1348.
44. Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. *Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids*. Lipids 1995;30:277-290.
45. Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato K. *Membrane damage due to lipid oxidation*. Am J Clin Nutr 1991;53:201S-205S.
46. Fukuda A, Nakamura Y, Ohigashi H, Osawa T, Uchida K. *Cellular response to the redox active lipid peroxidation products: Induction of glutathione S-transferase P by 4-hydroxy-2-nonenal*. Biochem Biophys Res Commun 1997;236:505-509.
47. Sies H, De Groot H. *Role of reactive oxygen species in cell toxicity*. Toxicol Lett 1992;64-65:547-551.
48. Simchowicz L, Foy MA, Cragoe EJ. *A role for Na^{+}/Ca^{2+} exchange in the generation of superoxide radicals by human neutrophils*. J Biol Chem 1990;265:13449-13456.
49. Brown RK, Kelly FJ. *Role of free radicals in the pathogenesis of cystic fibrosis*. Thorax 1994;49:738-742.

50. Halliwell B. *The biological toxicity of free radicals and other reactive oxygen species*. Dans: Free radicals and food additives, Ed: Aruoma OI, Halliwell B. London: Taylor & Francis. 1991;37-57.
51. Kappus H. *Lipid Peroxidation: mechanism and biological relevance*. Dans: Free radicals and food additives, Ed. Aruoma OI, Halliwell B. London: Taylor & Francis, 1991;59-75.
52. Meguro H, Akasaka K, Ohru H. *Determination of hydroperoxides with fluorometric reagent diphenyl-1-pyrenylphosphine*. Methods Enzymol 1990;186:157-160.
53. Tokumaru S, Ogino R, Shiromoto A, Iguchi H, Kojo S. *Increase of lipid hydroperoxides in tissues of vitamin E-deficient rats*. Free Radic Res 1997;26:169-174.
54. Vossen RCRM, Van Dam-Mieras MCE, Hornstra G, Zwaal RFA. *Continuous monitoring of lipid peroxidation by measuring conjugated diene formation in an aqueous liposome suspension*. Lipids 1993;28:857-861.
55. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. *Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors*. Clin Chem 1997;43:1209-1214.
56. Esterbauer H, Wäg G, Puhl H. *Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis*. Br Med Bull 1993;49:566-576.
57. Halliwell B, Chirico S. *Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance*. Am J Clin Nutr 1993;57 Suppl.:715S-725S.
58. Weber GF. *The measurement of oxygen-derived free radicals and related substances in medicine*. J Clin Chem Clin Biochem 1990;28:569-603.
59. Wu GS, Sevanian A, Rao NA. *Detection of retinal lipid hydroperoxides in experimental uveitis*. Free Radic Biol Med 1992;12:19-27.
60. Frankel EN. *Recent advances in lipid oxidation*. J Sci Food Agric 1991;54:495-511.

61. Sergent O, Morel I, Cogrel P, Chevanne M, Padeloup N, Brissot P, Lescoat G, Cillard P, Cillard J. *Simultaneous measurements of conjugated dienes and free malondialdehyde, used as a micromethod for the evaluation of lipid peroxidation in rat hepatocyte cultures.* Chem Phys Lipids 1993;65:133-139.
62. Lunec J. *Oxygen radicals: their measurement in vivo.* Analyt Proc 1989;26:130-131.
63. Banni S, Salgo MG, Evans RW, Corongiu FP, Lombardi B. *Conjugated diene and trans fatty acids in tissue lipids of rats fed an hepatocarcinogenic choline-devoid diet.* Carcinogenesis 1990;11:2053-2057.
64. Tamura H, Shibamoto T. *Gas chromatographic analysis of malonaldehyde and 4-hydroxy-2-(E)-nonenal produced from arachidonic acid and inoleic acid in a lipid peroxidation model system.* Lipids 1991;26:170-173.
65. Janero DR. *Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury.* Free Radic Biol Med 1990;9:515-540.
66. Esterbauer H. *Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products.* Am J Clin Nutr 1993;57 Suppl.:779S-786S.
67. Natarajan V, Scribner WM, Taher MM. *4-hydroxynonenal, a metabolite of lipid peroxidation, activates phospholipase D in vascular endothelial cells.* Free Radic Biol Med 1993;15:365-375.
68. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.* Free Radic Biol Med 1991;11:81-128.
69. Draper HH, Hadley M. *Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation.* Methods Enzymol 1990;186:421-431.
70. Dhanakoti SN, Draper HH. *Response of urinary malondialdehyde to factors that stimulate lipid peroxidation in vivo.* Lipids 1987;22:643-646.
71. Zidenberg-Cheer S, Olin KL, Villanueva J, Tang A, Phinney SD, Halsted CH, Keen CL. *Ethanol-induced changes in hepatic free radical defense mechanisms and fatty-acid composition in the miniature pig.* Hepatology 1991;13:1185-1192.

72. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. *A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials.* Free Radic Biol Med 1993;15:353-363.
73. Kohlmüller D, Kochen W. *Is n-pentane really an index of lipid peroxidation in humans and animals? A methodological reevaluation.* Anal Biochem 1993;210:268-276.
74. Kazui M, Andreoni KA, Norris EJ, Klein AS, Burdick JF, Beattie C, Sehnert SS, Bell WR, Bulkley GB, Risby TH. *Breath ethane: a specific indicator of free-radical mediated lipid peroxidation following reperfusion of the ischemic liver.* Free Radic Biol Med 1992;13:509-515.
75. Cailleux A, Allain P. *Is pentane a normal constituent of human breath.* Free Radic Res Commun 1993;18:323-327.
76. Kneepkens CMF, Lepage G, Roy CC. *The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation.* Free Radic Biol Med 1994;17:127-160.
77. Aruoma OI. *Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants.* Fd Chem Toxic 1994;32:671-683.
78. Purdue PE, Lazarow PB. *Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence.* J Cell Biol 1996;134:849-862.
79. Harris ED. *Regulation of antioxidant enzymes.* FASEB J 1992;6:2675-2683.
80. Spear N, Aust SD. *Effects of glutathione on Fenton reagent-dependent radical production and DNA oxidation.* Arch Biochem Biophys 1995;324:111-116.
81. Wilke BC, Vidailhet M, Favier A, Guillemin C, Ducros V, Arnaud J, Richard MJ. *Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation.* Clin Chim Acta 1992;207:137-142.
82. Liebler DC. *The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E.* Crit Rev Toxicol 1993;23:147-169.

83. Meydani M. *Vitamin E*. Lancet 1995;345:170-175.
84. Princen HMG, Van Duyvenvoorde W, Buytenhek R, van der Laarse A, Van Poppel G, Gevers Leuven JA, Van Hinsbergh VWM. *Supplementation with low doses of vitamin E protects LDL from lipid peroxidation in men and women*. Arterioscler Thromb 1995;15:325-333.
85. Appelkwist EL, Reinhart M, Fischer R, Billheimer J, Dallner G. *Presence of individual enzymes of cholesterol biosynthesis in rat liver peroxisomes*. Arch Biochem Biophys 1990;282:318-325.
86. Wolf G. *Gamma-tocopherol: An efficient protector of lipids against nitric oxide-initiated peroxidative damage*. Nutrition Reviews 1997;55:376-378.
87. Cohn W, Loechleiter F, Weber F. *α -Tocopherol is secreted from rat liver in very low density lipoproteins*. J Lipid Res 1988;29:1359-1366.
88. Dutta-Roy AK, Gordon MJ, Campbell FM, Duthie GG, James WPT. *Vitamin E requirements, transport, and metabolism: Role of α -tocopherol-binding proteins*. J Nutr Biochem 1994;5:562-570.
89. Halliwell B. *Free radicals and antioxidants: a personal view*. Nutr Rev 1994;452:253-265.
90. Chan AC. *Partners in defense, vitamin E and vitamin C*. Can J Physiol Pharmacol 1993;71:725-731.
91. Berliner JA, Heineche JW. *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*. Free Rad Biol Med 1996;20:707-727.
92. Rice-Evans CA, Sampson J, Bramley PM, Holloway DE. *Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo?* Free Radic Res 1997;26:381-398.
93. Carpenter KLH, Van der Veen C, Hird R, Dennis IF, Ding T, Mitchinson MJ. *The carotenoids β -carotene, canthaxanthin and zeaxanthin inhibit macrophage-mediated LDL oxidation*. FEBS Lett 1997;401:262-266.
94. Sies H, Stahl W. *Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants*. Am J Clin Nutr 1995;62:1315S-1321S.
95. Palozza P, Calviello G, Bartoli GM. *Prooxidant activity of β -carotene under 100% oxygen pressure in rat liver microsomes*. Free Radic Biol Med 1995;19:887-892.

96. Kikugawa K, Hiramoto K, Tomiyama S, Asano Y. *β -carotene effectively scavenges toxic nitrogen oxides: Nitrogen dioxide and peroxyxynitrous acid.* FEBS Lett 1997;404:175-178.
97. Tsuchihashi H, Kigoshi N, Iwatsuki M, Niki E. *Action of β -carotene as an antioxidant against lipid peroxidation.* Arch Biochem Biophys 1995;323:137-147.
98. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. *Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene.* Am J Clin Nutr 1995;62:1322S-1326S.
99. Everett SA, Dennis MF, Patel KB, Maddix S, Kundu SC, Willson RL. *Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl, and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant β -carotene.* J Biol Chem 1996;271:3988-3994.
100. Valgimigli L, Lucarini M, Pedulli GF, Ingold KU. *Does β -carotene really protect vitamin E from oxidation?* J Am Chem Soc 1997;119:8095-8096.
101. Palacios A, Piergiacomini VA, Catala A. *Vitamin A supplementation inhibits chemiluminescence and lipid peroxidation in isolated rat liver microsomes and mitochondria.* Mol Cell Biochem 1996;154:77-82.
102. Ciaccio M, Valenza M, Tesoriere L, Bongiorno A, Albiero R, Livrea MA. *Vitamin A inhibits doxorubicin-induced membrane lipid peroxidation in rat tissues in vivo.* Arch Biochem Biophys 1993;302:103-108.
103. Tesoriere L, D'Arpa D, Re R, Livrea MA. *Antioxidant reactions of all-trans retinol in phospholipid bilayers: Effect of oxygen partial pressure, radical fluxes, and retinol concentration.* Arch Biochem Biophys 1997;343:13-18.
104. Livrea MA, Tesoriere L, Bongiorno A, Pintaudi AM, Ciaccio M, Riccio A. *Contribution of vitamin A to the oxidation resistance of human low density lipoproteins.* Free Radic Biol Med 1995;18:401-409.
105. Tesoriere L, Bongiorno A, Pintaudi AM, D'Anna R, D'Arpa D, Livrea MA. *Synergistic interactions between vitamin A and vitamin E against lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomes.* Arch Biochem Biophys 1996;326:57-63.
106. Erdman J. *The physiologic chemistry of carotenes in man.* Clin Nutr 1988;7:101-106.

107. Ong ASH, Tee ES. *Natural sources of carotenoids from plants and oils.* Methods Enzymol 1992;213:142-167.
108. Underwood BA. *Vitamin A in animal and human nutrition.* Dans: The retinoid. Ed Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS. Vol I. New York: Academic Press, 1984;281-392.
109. Davidson NO, Magun AM. *Intestinal lipid absorption.* Dans: Textbook of Gastroenterology, Ed: Yamada, Alpers, Owyang, Vol. I. Lippincott, J.B. 1991; 353-381.
110. Prince MR, Frisoli JK. *Beta-carotene accumulation in serum and skin.* Am J Clin Nutr 1993;57:175-181.
111. Edes TE, Walk BE, Thornton WH, Fritsche KL. *Essential fatty acid sufficiency does not preclude fat-soluble-vitamin deficiency in short-bowel syndrome.* Am J Clin Nutr 1991;53:499-502.
112. Alam BS, Alam SQ, Bendich A, Shapiro SS. *Effect of dietary lipids on hepatic and plasma β -carotene and vitamin A levels in rat fed β -carotene.* Nutr Cancer 1989;12:57-60.
113. Porter HP, Saunders DR, Tytgat G. *Fat absorption in bile fistula man: a morphological and biochemical study.* Gastroenterology 1971;60:1008.
114. Sokol RJ, Butler-Simon N, Heubi JE, Iannaccone ST, McClung HJ, Accurso F, Hammond K, Heyman M, Sinatra F, Riely C, Perreault J, Levy J, Silverman A. *Vitamin E deficiency neuropathy in children with fat malabsorption.* Ann NY Acad Sci 1991;146-169.
115. Amédée-Manesme O, Mourey MS, Therasse J, Couturier M, Alvarez F, Hanck A, Bernard O. *Short- and long-term vitamin A treatment in children with cholestasis.* Am J Clin Nutr 1988;47:690-693.
116. Dietz JM, Sri Kantha S, Erdman JW Jr. *Reverse phase HPLC analysis of α - and β -carotene from selected raw and cooked vegetables.* Plant Foods Human Nutr 1988;38:333-341.
117. Leroy C, Lepage G, Morin CL, Bertrand JM, Larue-Dufour O, Roy CC. *Effect of dietary fat and residues on fecal loss of sterols and on their microbial degradation in cystic fibrosis.* Dig Dis Sci 1986;31:911-918.

118. Alam BS, Brown LR, Alam SQ. *Influence of dietary fats and vitamin E on plasma and hepatic vitamin A and β -carotene levels in rats fed excess β -carotene.* Nutr Cancer 1990;14:111-116.
119. Nierenberg DW, Stukel TA, Baron JA, Dain BJ, Greenberg ER. *Determinants of increase in plasma concentration of β -carotene after chronic oral supplementation.* Am J Clin Nutr 1991;53:1443-1449.
120. Hollander D, Ruble PE. *Beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH and flow rate effects on transport.* Am J Physiol 1978;235:E686-E692.
121. Green PHR, Glickman RM. *Intestinal lipoprotein metabolism.* J Lipid Res 1981;22:1153-1173.
122. Tang G, Krinsky NI. *Differentiation between central and excentric cleavage of β -carotene.* Methods Enzymol 1993;214:69-74.
123. Harrison EH. *Enzymes catalysing the hydrolysis of retinyl esters.* Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab 1993;170:99-108.
124. Couderc R, Dehoux SM, Tallet F. *Apolipoprotéines et métabolisme plasmatique des lipoprotéines.* Nutr Clin Métabol 1988;2:134-141.
125. Kaplan LA, Lau JM, Stein EA. *Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs.* Clin Physiol Biochem 1992;8:1-10.
126. Baudet MF, Dachet C, Lasserre M, Estena O, Jacotot B. *Modification in the composition and metabolic properties of human low density and high density lipoproteins by different dietary fats.* J Lipid Res 1984;25:456-468.
127. Johnson EJ, Russell RM. *Distribution of orally administered β -carotene among lipoproteins in healthy men.* Am J Clin Nutr 1992;56:128-135.
128. Gilbert AM, Stich HF, Rosin MP, Davison AJ. *Variation in the uptake of β -carotene in the oral mucosa of individuals after 3 days of supplementation.* Int J Cancer 1990;45:855-859.
129. Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. *Transport and storage of vitamin A.* Science 1990;250:399-404.
130. Hathcock HN, Hattan DG, Jenkins MY, McDonnald JT, Sundaresan PR, Wilkening VL. *Evaluation of vitamin A toxicity.* Am J Clin Nutr 1990;52:183-202.

131. Blomhoff R. *Transport and metabolism of vitamin A*. Nutr Rev 1994;52:S13-S23.
132. Blomhoff R, Green MH, Norum KR. *Vitamin A: physiological and biochemical processing*. Annu Rev Nutr 1992;12:37-57.
133. Bendich A, Olson JA. *Biological actions of carotenoids*. FASEB J 1989;3:1927-1932.
134. Rahmathullah L, Underwood BA, Thulashiraj RD, Milton RC, Ramaswamy K, Rahmathullah R, Babu G. *Reduced mortality among children in southern India receiving a small weekly dose of vitamin A*. N Engl J Med 1990;323:929-935.
135. Wolf G. *A transporter specific for retinol in the brush border of rat small intestine*. Nutr Rev 1995;53:44-45.
136. Ahmed F, Ellis J, Murphy J, Wootton S, Jackson AA. *Excessive faecal losses of vitamin A (retinol) in cystic fibrosis*. Arch Dis Child 1990;65:589-593.
137. Ong DE, Page DL. *Cellular retinol-binding protein (type two) is abundant in human small intestine*. J Lipid Res 1987;28:739-745.
138. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. *Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med 1989;320:915-924.
139. Herr FM, Wardlaw SA, Kakkad B, Albrecht A, Quick TC, Ong DE. *Intestinal vitamin A metabolism: Coordinate distribution of enzymes and CRBP (II)*. J Lipid Res 1993;34:1545-1554.
140. Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR. *Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage*. Physiol Rev 1991;71:951-990.
141. Ahn J, Koo SI. *The lymphatic absorption of retinol (ROH) and secretion of phospholipid (PL) are impaired in zinc (Zn) and essential fatty acid (EFA) deficient rats*. FASEB J 1993;7:A511 (Abstract).
142. Smeland S, Bjerknes T, Malaba L, Eskild W, Norum KR, Blomhoff R. *Tissue distribution of the receptor for plasma retinol-binding protein*. Biochem J 1995;305:419-424.

143. Harrison EH, Gad MZ, Ross AC. *Hepatic uptake and metabolism of chylomicron retinyl esters: probable role of plasma membrane/endosomal retinyl ester hydrolases.* J Lipid Res 1995;36:1498-1506.
144. Yamamoto Y, Yoshizawa T, Kamio S, Aoki O, Kawamata Y, Masushige S, Kato S. *Interactions of transthyretin (TTR) and retinol-binding protein (RBP) in the uptake of retinol by primary rat hepatocytes.* Exp Cell Res 1997;234:373-378.
145. Ronne HC, Ocklind C, Wiman K. *Ligand-dependent regulation of intracellular protein transport: effect of vitamin A on the secretion of the retinol-binding protein.* J Cell Biol 1983;96:907-910.
146. Van Bennekum AM, Blaner WS, Seifert-Boele I, Moukides M, Brouwer A, Hendriks HFJ. *Retinol uptake from retinol-binding-protein (RBP) by liver parenchymal cells in vitro does not specifically dependent on its binding to RBP.* Biochemistry 1993;32:1727-1733.
147. Matsuura T, Nagamori S, Hasumura S, Sujino H, Shimizu K, Nüya M, Hirosawa K. *Retinol transport in cultured stellate cells of rat liver: Studies by light and electron microscope autoradiography.* Exp Cell Res 1993;206:111-118.
148. Troen G, Nilsson A, Norum KR, Blomhoff R. *Characterization of liver stellate cell retinyl ester storage.* Biochem J 1994;300:793-798.
149. Nyberg A, Berne B, Nordlinder H, Busch C, Eriksson U, Loof L, Vahlquist A. *Impaired release of vitamin A from liver in primary biliary cirrhosis.* Hepatology 1988;8:136-141.
150. Attard-Montalto S, Evans N, Sherwood RA. *Carotenaemia with low vitamin A levels and low retinol-binding protein.* J Inherited Metab Dis 1992;15:929-930.
151. Singh M, Singh VN. *Fatty liver hypervitaminosis A: synthesis and release of hepatic triglycerides.* Am J Physiol 1978;234:E511-E514.
152. Creek KE, St.Hilaire P, Hodam JR. *A comparison of the uptake, metabolism and biologic effects of retinol delivered to human keratinocytes either free or bound to serum retinol-binding protein.* J Nutr 1993;123 Suppl.:356-361.

153. Weber FL, Mitchell GE, Powell De, Reiser BJ, Banwel JG. *Reversible hepatotoxicity associated with hepatic vitamin A accumulation in a protein-deficient patient.* Gastroenterology 1982;82:118-123.
154. Krasinski SD, Russell RM, Otradovec CL, Sadowski JA, Hartz SC, Jacob RA, McGrandy RB. *Relationship of vitamin A and vitamin E intake to fasting plasma retinol, retinol-binding protein, retinyl esters, carotene, Alpha-tocopherol, and cholesterol among elderly people and young adults: increased plasma retinyl esters among vitamin A-supplement users.* Am J Clin Nutr 1989;49:112-120.
155. Burton GW, Ingold KU. *Vitamin E: applications of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function.* Acc Chem Res 1986;19:194-201.
156. Bunyan J, McHale D, Green J, Marcinkiewics S. *Biological potencies of ϵ - and ξ_1 -tocopherol and 5-methyltocol.* Br J Nutr 1961;15:253-257.
157. Drevon CA. *Absorption, transport and metabolism of vitamin E.* Free Rad Res Comms 1991;14:229-246.
158. Zimmerman JJ. *Bronchoalveolar inflammatory pathophysiology of bronchopulmonary dysplasia.* Clin Perin 1995;22:429-456.
159. Traber MG, Kayden HJ. *Preferential incorporation of α -tocopherol vs γ -tocopherol in human lipoproteins.* Am J Clin Nutr 1989;49:517-526.
160. MacMahon MT, Neale G. *The absorption of α -tocopherol in control subjects and in patients with intestinal malabsorption.* Clin Sci 1970;38:197-210.
161. Traber MG, Kayden HJ, Green JB, Green MH. *Absorption of water-miscible forms of vitamin E in a patient with cholestasis and in rats.* Am J Clin Nutr 1986;44:914-923.
162. Gallo-Torres H. *Obligatory role of bile for the intestinal absorption of vitamin E.* Lipids 1970;5:379-384.
163. Sokol RJ, Heubi JE, Iannaccone S, Bove KE, Harris RE, Balistreri WF. *The mechanism causing vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis.* Gastroenterology 1983;85:1172-1182.

164. Traber MG, Burton GW, Ingold KU, Kayden HJ. *RRR- and SRR- α -tocopherols are secreted without discrimination in human chylomicrons, but RRR- α -tocopherol is preferentially secreted in very low density lipoproteins.* J Lipid Res 1990;31:675-685.
165. Traber MG, Sokol RJ, Burton GW, Ingold KU, Papas AM, Huffaker JE, Kayden HJ. *Impaired ability of patients with familial isolated vitamin E deficiency to incorporate α -tocopherol into lipoproteins secreted by the liver.* J Clin Invest 1990;85:397-407.
166. Dimitrov MV, Meyer C, Gilliland D, Ruppenthal M, Chenowith W, Malone W. *Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E.* Am J Clin Nutr 1991;53:723-729.
167. Lee-Kim YC, Meydani M, Kassarian Z, Blumberg JB, Russell RM. *Enterohepatic circulation of newly administered α -tocopherol in the rat.* Int J Vit Nutr Res 1988;58:284-291.
168. Bendich A, Machlin LJ. *Safety of oral intake of vitamin E.* Am J Clin Nutr 1988;48:612-619.
169. Bieri JG, Hoeg JM, Schaefer EJ, Zech LA, Brewer HB. *Vitamin A and vitamin E replacement in abetalipoproteinemia.* Ann Int Med 1984;100:238-239.
170. Kayden HJ, Traber MG. *Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans.* J Lipid Res 1993;34:343-358.
171. 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.
172. Hofmann AF. *Bile acids.* Dans: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The Liver: Biology and Pathobiology.* Third Ed. New York: Raven Press, Ltd. 1994;677-718.
173. Montet JC. *L'acide ursodeoxycholique propriétés physiques et activité hépatoprotectrice.* Path Biol 1991;39:621-624.
174. Kamp F, Hamilton JA. *Movement of fatty acids, fatty acid analogues, and bile acids across phospholipid bilayers.* Biochemistry 1993;32:11074-11086.

175. Takikawa H, Sano N, Narita T, Yamannaka M. *The ursodeoxycholate dose-dependent formation of ursodeoxycholate-glucuronide in the rat and the choleric potencies.* Hepatology 1990;11:743-749.
176. Yamashiro Y, Ohtsuka Y, Shimizu T, Nittono H, Urao M, Miyano T, Kawakami S, Hayasawa H. *Effects of ursodeoxycholic acid treatment on essential fatty acid deficiency in patients with biliary atresia.* J Pediatr Surg 1994;29:425-428.
177. Bilik R, Superina RA, Phillips J, Edwards V. *Prevention of biliary cirrhosis following hepatic arterial thrombosis after liver transplantation in children by using ursodeoxycholic acid.* J Pediatr Surg 1995;30:49-52.
178. Colombo C, Battezzati PM, Podda M, Bettinardi N, Giunta A. *Ursodeoxycholic acid for liver disease associated with cystic fibrosis: A double-blind multicenter trial.* Hepatology 1996;23:1484-1490.
179. Balan V, Dickson ER, Jorgensen RA, Lindor KD. *Effect of ursodeoxycholic acid on serum lipids of patients with primary biliary cirrhosis.* Mayo Clin Proc 1994;69:923-929.
180. Combes B, Carithers RL Jr, Maddrey WC, Lin DY, McDonald MF, Wheeler DE, Eigenbrodt EH, Munoz SJ, Rubin R, Garcia-Tsao G, Bonner GF, West AB, Boyer JL, Luketic VA, Shiffman ML, Mills AS, Peters MG, White HM, Zetterman RW, Rossi SS, Hofmann AF, Markin RS. *A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis.* Hepatology 1995;22:579-766.
181. Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Walker V, Bailey RJ, Blendis LM, Ghent CN, Michieletti P, Minuk GY, Pappas SC, Scully LJ, Steinbrecher UP, Sutherland LR, Williams CN, Witt-Sullivan H, Worobetz LJ, Milner RA, Wanless IR. *The canadian multicenter double-blind randomized controlled trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis.* Hepatology 1994;19:1149-1156.
182. Sokol RJ, Devereaux M, Khandwala R, O'Brien K. *Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rather patocytes.* Hepatology 1993;17:869-881.

183. Crosignani A, Podda M, Battezzati PM, Zuin M, Bertolini E, Watson D, Setchell KDR. *Changes in bile acid composition in patients with primary biliary cirrhosis induced by ursodeoxycholic acid administration.* Hepatology 1991;14:1000-1007.
184. Lacaille F, Paradis K. *The immunosuppressive effect of ursodeoxycholic acid: a comparative in vitro study on human peripheral blood mononuclear cells.* Hepatology 1993;18:165-172.
185. Botla R, Spivey JR, Aguilar H, Bronk SF, Gores GJ. *Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: A mechanism of UDCA cytoprotection.* J Pharmacol Exp Ther 1995;272:930-938.
186. Krähenbühl S, Fischer S, Talos C, Reichen J. *Ursodeoxycholate protects oxidative mitochondrial metabolism from bile acid toxicity: Dose-response study in isolated rat liver mitochondria.* Hepatology 1994;20:1595-1601.
187. Hattori Y, Murakami Y, Hattori S, Kuroda H, Kasai K, Shimoda SI. *Ursodeoxycholic acid inhibits the induction of nitric oxide synthase.* Eur J Pharmacol 1996;300:147-150.
188. Invernizzi P, Salzman AL, Szabo C, Ueta I, O'Connor M, Setchell KDR. *Ursodeoxycholate inhibits induction of NOS in human intestinal epithelial cells and in vivo.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 1997;273:G131-G138.
189. Roy CC, Weber AM, Morin CL, Combes JC, Nusslé D, Mégevand A, Lasalle R. *Abnormal biliary lipid composition in cystic fibrosis: effect of pancreatic enzymes.* N Engl J Med 1977;297:1301-1305.
190. Christophe A, Robberecht E. *Current knowledge on fatty acids in cystic fibrosis.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1996;55:129-138.
191. Thompson MW, McInnes RR, Willard HF. *Genes in populations.* Dans: *Genetics in medicine.* Montréal. WB Saunders Company, 5 ed, 1991:143-165.

192. Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. *Das Coeliaksyndrom bei Angeborener zystischer Pankreas fibromatose und Bronchiektasien*. Wein Med Wschr 1936;86:753-756.
193. Andersen DH. *Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease*. Amer J Dis Child 1938;56:344-399.
194. Britton JR. *Effects of social class, sex, and region of residence on age at death from cystic fibrosis*. Br Med J 1989;298:483-487.
195. Shale DJ. *Predicting survival in cystic fibrosis*. Thorax 1997;52:309-309.
196. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B-S, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Buchwald M, Riordan JR, Tsui L-C, Collins FS. *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping*. Science 1989;245:1059-1065.
197. Rozen R, De Braekeleer M, Daigneault J, Ferreira-Rajabi L, Gerdes M, Lamoureux L, Aubin G, Simard F, Fujiwara TM, Morgan K. *Cystic fibrosis mutation in French Canadians: Three CFTR mutations are relatively frequent in a Quebec population with an elevated incidence of cystic fibrosis*. Am J Med Genet 1992;42:360-364.
198. Strandvik B, Svensson E, Seyberth HW. *Prostanoid biosynthesis in patients with cystic fibrosis*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1996;55:419-425.
199. Thomas PJ, Pedersen PL. *Effects of the DeltaF508 mutation on the structure, function, and folding of the first nucleotide-binding domain of CFTR*. J Bioenerg Biomembr 1993;25:11-19.
200. Colin AA, Wohl MEB. *Cystic fibrosis*. Pediatr Rev 1994;15:192-200.
201. Shen BQ, Mrsny RJ, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. *Role of CFTR in chloride secretion across human tracheal epithelium*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 1995;269:L561-L566.
202. Roy CC, Silverman A, Alagille D. *Cystic fibrosis*. Dans: Pediatric Clinical Gastroenterology. St-Louis: CV Mosby Company, 4 ed, 1995:963-985.

203. Gibson LE, Cooke RE. *A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing in pilocarpine by iontophoresis.* Pediatrics 1959;23:545-549.
204. 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.
205. Ramsey BW. *Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis.* N Engl J Med 1996;335 no3:179-188.
206. Wine JJ. *Cystic fibrosis: How do CFTR mutations cause cystic fibrosis?* Curr Biol 1995;5:1357-1359.
207. Zach MS. *Lung Disease in Cystic Fibrosis — An Updated Concept.* Pediatr Pulmonol 1990;8:188-202.
208. Suter S. *The imbalance between granulocyte neutral proteases and antiproteases in bronchial secretions from patients with cystic fibrosis.* Antibiot Chemother 1989;42:158-168.
209. Sommerhoff CP, Nadel JA, Basbaum CB, et al. *Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from culture bovine airway gland serous cells.* J Clin Invest 1990;85:682-689.
210. Mouton JW, Kerrebijn KF. *Antibacterial therapy in cystic fibrosis.* Med Clin North America 1990;74:836-849.
211. Navarro J. *Vision actuelle et perspective de la thérapeutique dans la mucoviscidose.* Le Pédiatre 1993;138:67-71.
212. Scheele GA, Fukuoka SI, Kern HF, Freedman SD. *Pancreatic dysfunction in cystic fibrosis occurs as a result of impairments in luminal pH, apical trafficking of zymogen granule membranes, and solubilization of secretory enzymes.* Pancreas 1996;12:1-9.
213. Silverman A, Roy CC. *Cystic fibrosis.* Dans: Pediatric Clinical Gastroenterology. St-Louis: CV Mosby Company, 3 ed, 1983:814-837.

214. 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.
215. Collins CE, O'Loughlin EV, Henry R. *Discrepancies between males and females with cystic fibrosis in dietary intake and pancreatic enzyme use.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1998;26:258-262.
216. Scott-Jupp R, Lama M, Tanner MS. *Prevalence of liver disease in cystic fibrosis.* Arch Dis Child 1991;66:698-701.
217. Galabert C, Lengrand D, Montet JC, Dimier JL, Chazalette JP. *Utilisation de l'acide ursodeoxycholique dans le traitement des complications hépatobiliaires de la mucoviscidose.* Path Biol 1991;39:625-628.
218. Seymour CA. *The liver in cystic fibrosis.* Dans: *Oxford textbook of clinical hepatology*, Oxford, England: 1991, McIntyre N. éd. Oxford Medical Publication.
219. Colombo C, Apostolo MG, Ferrari M, Seia M, Genoni S, Giunta A, Sereni LP. *Analysis of risk factors for the development of liver disease associated with cystic fibrosis.* J Pediatr 1994;124:393-399.
220. Colombo C, Apostolo MG, Assaisso M, Roman B, Bottani P. *Liver disease in cystic fibrosis.* Neth J Med 1992;41:119-122.
221. Lacaille F. *Foie et mucoviscidose.* Gastroenterol Clin Biol 1997;21:607-618.
222. Hultcrantz R, Mengarelli S, Strandvik B. *Morphological finding in the liver of children with cystic fibrosis: a light and electron microscopical study.* Hepatology 1986;6:881-889.
223. Strandvik B, Einarsson K, Lindblad A, Angelin B. *Bile acid kinetics and biliary lipid composition in cystic fibrosis.* J Hepatol 1996;25:43-48.
224. Strandvik B, Hultcrantz R. *Liver function and morphology during long-term fatty acid supplementation in cystic fibrosis.* Liver 1994;14:32-36.
225. Bentur L, Kalnins D, Levison H, Corey M, Durie PR. *Dietary intakes of young children with cystic fibrosis: Is there a difference.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1996;22 no 3:254-258.

226. Chase HP, Long MA, Lavin MH. *Cystic fibrosis and malnutrition*. J Pediatr 1979;95:337-347.
227. Pencharz PB. *Energy intakes and low-fat diets in young children with cystic fibrosis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1983;2:400-402.
228. Henley LD, Hill ID. *Global and specific disease-related information needs of cystic fibrosis patients and their families*. Pediatrics 1990;85:1015-1020.
229. Foster SW, Farrell PM. *Enhancing nutrition in cystic fibrosis with comprehensive therapies*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1996;22 no3:238-239.
230. Vaisman N, Pencharz PB, Corey M, Canny GJ, Hahn E. *Energy expenditure of patients with cystic fibrosis*. J Pediatr 1987;111:496-500.
231. Pencharz PB, Durie PR. *Nutritional management of cystic fibrosis*. Annu Rev Nutr 1993;13:111-136.
232. Lawrence R, Sorrell T. *Eicosapentaenoic acid in cystic fibrosis: Evidence of a pathogenetic role for leukotriene B₄*. Lancet 1993;342:465-469.
233. Lazarrow PB. *The Liver: Biology and Pathobiology*. New York: Raven Press, Ltd., 1988;241-254.
234. De Duve C, Baudhuin P. *Peroxisomes (microbodies and related particles)*. Physiol Rev 1966;46:323-357.
235. Goldfischer S, Moore CL, Johnson AB, et al. *Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome*. Science 1972;182:62-64.
236. Van den Bosch H, Schutgens RBH, Tager JM. *Biochemistry of peroxisomes*. Annu Rev Biochem 1992;61:157-197.
237. Moser HW. *Peroxisomal disorders*. Clin Biochem 1991;24:343-351.
238. Goldfischer SL. *Peroxisomal diseases*. Dans: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver: biology and pathobiology*. 2 Ed. New York: Raven Press. 1988;255-267.
239. Doherty JF, Golden MHN, Brooks SEH. *Peroxisomes and the fatty liver of malnutrition: an hypothesis*. Am J Clin Nutr 1991;54:674-677.
240. Vamecq J, Poll-The BT, Saudubray JM. *Biochimie du peroxyosome et maladies peroxysomiales*. Ann Biol Clin 1988;46:233-258.

241. Singh I. *Biochemistry of peroxisomes in health and disease*. Mol Cell Biochem 1997;167:1-29.
242. Oettl K, Malle E, Grillhofer H, Sattler W, Kostner GM. *Cholesterol metabolism in cells with different peroxisomal defects*. Clin Chim Acta 1996;251:131-143.
243. GrØnn M, Christensen E, Hagve TA, Christophersen BO. *Peroxisomal retroconversion of docosahexaenoic acid (22:6(n-3)) to eiosapentaenoic acid (25:5(n-3)) studied in isolated rat liver cells*. Biochem Biophys Acta 1991;1081:85-91.
244. Masters CJ. *Cellular signalling: The role of the peroxisome*. Cell Signal 1996;8:197-208.
245. Mannaerts GP, Van Veldhoven P, Van Broekhoven A, Vanderbroeck G, Debeer LJ. *Evidence that peroxisomal acyl-CoA synthetase is located at the cytoplasmic side of the peroxisomal membrane*. Biochem J 1982;204:17-23.
246. Erdmann R, Veenhuis M, Kunau WH. *Peroxisomes: organelles at the crossroads*. Trends Cell Biol 1997;7:400-407.
247. Kunau W-H, Dommes V, Schulz H. *β -oxidation of fatty acids in mitochondria peroxisomes and bacteria: a century of continued progress*. Prog Lipid Res 1995;34 no3:267-342.
248. Novikov DK, Vanhove GF, Carchon H, Asselberghs S, Eyssen HJ, van Veldhoven PP, Mannaerts GP. *Peroxisomal β -oxidation. Purification of four novel 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases from rat liver peroxisomes*. J Biol Chem 1994;269:27125-27135.
249. Osmundsen H. *Peroxisomal β -oxidation of long fatty acids: effects of high fat diets*. Ann NY Acad Sci USA 1982;386:13-29.
250. Hiltunen JK, Karbi T, Hassinen IE, Osmundsen H. *β -oxidation of polyunsaturated fatty acids by rat liver peroxisomes. A role of 2,4-dienoyl-coenzyme A reductase in peroxisomal β -oxidation*. J Biol Chem 1986;261:16484-16493.

251. Hiltunen JK, Filppula SA, Häyrynen HM, Koivuranta KT, Hakkola EH. *Peroxisomal β -oxidation of polyunsaturated fatty acids*. *Biochimie* 1993;75:175-182.
252. Poulos A. *Very long chain fatty acids in higher animals — A review*. *Lipids* 1995;30:1-14.
253. Moser HW, Moser AB. *Very long-chain fatty acids in diagnosis, pathogenesis, and therapy of peroxisomal disorders*. *Lipids* 1996;31 Suppl:S141-S144.
254. Steinberg SJ, Fensom AH, Dalton NR, Toseland PA, Kennedy CR, Mowat AP. *Measurement of plasma very long-chain fatty acids as a preliminary screening procedure for the diagnosis of peroxisomal disorders*. *J Inherited Metab Dis* 1994;17:323-326.
255. Horrocks LA, Sharma M. *Plasmalogens and O-alkylglycerophospholipids*. Dans: *Phospholipids*, Ed.: Hawthorne JN, Ansell GB, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, 1982.
256. Rawn JD. *Structure des membranes biologiques*. Dans: *Traité de Biochimie*, Ed. Du Renouveau Pédagogique, De Boeck-Wesmael Press, Belgique, 1990;209-232.
257. Hajra AK, Burke CL, Jones CL. *Subcellular localization of acyl-coenzyme A: dihydroxyacetone phosphate acyltransferase in rat liver peroxisomes (microbodies)*. *J Biol Chem* 1979;254:10896-10900.
258. Hajra AK, Bishop JE. *Glycerolipid biosynthesis in peroxisomes via the acyl dihydroxyacetone phosphate pathway*. *Ann NY Acad Sci* 1982;386:170-181.
259. Hajra AK. *Biosynthesis of O-alkylglycerol ether lipids*. Dans: *Ether lipids: biochemical and biomedical aspects*, Ed.: Mangold HK, Paltauf F, Academic Press, New York, 1983;85-108.
260. Ballas LM, Lazarow PB, Bell RM. *Glycerolipid synthetic capacity of rat liver peroxisomes*. *Biochem Biophys Acta* 1984;795:297-300.
261. Van den Bosch H, De Vet ECJM, Zomer AWM. *The role of peroxisomes in ether lipid synthesis — Back to the roots of PAF*. *Adv Exp Med Biol* 1996;416:33-40.

262. Benveniste J, Vargaftig BB. *Platelet-activating factor: an ether lipid with biological activity*. Dans: Ether lipids: biochemical and biomedical aspects, Ed: Mangold HK, Paltauf F, Academic Press, New York, 1983;356.
263. Heymans HSA, Schutgens RBH, Tan R, Van den Bosch H, Borst P. *Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome)*. Nature 1983;306:69-70.
264. Farooqui AA, Rapoport SI, Horrocks LA. *Membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease: Deficiency of ethanolamine plasmalogens*. Neurochem Res 1997;22:523-527.
265. Steinberg D, Avigan J, Mize CE, Eldjarn L, Try K, Refsum S. *Conversion of U-¹⁴C-phytol to phytanic acid and its oxidation in hereditary ataxia polyneuritiformis*. Biochem Biophys Res Commun 1965;19:783-789.
266. Mize CE, Avigan J, Steinberg D, Pittman C, Fales HM, Milne CW. *A major pathway for the mammalian oxidative degradation of phytanic acid*. Biochim Biophys Acta 1969;176:720-739.
267. Muralidharan VB, Kishimoto Y. *Phytanic acid alpha-oxidation in rat liver. Requirement of cytosolic cofactor*. J Biol Chem 1984;259:13021-13026.
268. Draye JP, Van Hoof F, de Hoffmann E, Vamecq J. *Peroxisomal oxidation of L-2-hydroxyphytanic acid in rat kidney cortex*. Eur J Biochem 1987;167:573-578.
269. Vamecq J, Draye JP. *The enzymatic and mass spectrometry identification of 2-oxophytanic acid, a product of the peroxisomal oxidation of L-2-hydroxyphytanic acid*. Biomed Environment Mass Spectrom 1988;15:345-351.
270. Pahan K, Singh I. *Phytanic acid oxidation: Topographical localization of phytanoyl-CoA ligase and transport of phytanic acid into human peroxisomes*. J Lipid Res 1995;36:986-997.
271. Singh H, Poulos A. *Substrate specificity of rat liver mitochondrial carnitine palmitoyl transferase I: Evidence against α -oxidation of phytanic acid in rat liver mitochondria*. FEBS Lett 1995;359:179-183.

272. Watkins PA, Howard AE, Mihalik SJ. *Phytanic acid must be activated to phytanoyl-CoA prior to its α -oxidation in rat liver peroxisomes.* Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab 1994;1214:228-294.
273. Jansen GA, Mihalik SJ, Watkins PA, Moser HW, Jakobs C, Denis S, Wanders RJA. *Phytanoyl-CoA hydroxylase is present in human liver, located in peroxisomes, and deficient in Zellweger syndrome: Direct, unequivocal evidence for the new, revised pathway of phytanic acid α -oxidation in humans.* Biochem Biophys Res Commun 1996;229:205-210.
274. Herndon JH, Steinberg D, Uhlendorf BW, Fales HM. *Refsum's disease: characterization of the enzyme defect in cell culture.* J Clin Invest 1969;48:1017-1032.
275. Brown MS, Goldstein JL. *Koch's postulates for cholesterol.* Cell 1992;71:187-188.
276. Liscum L, Dahl NK. *Intracellular cholesterol transport.* J Lipid Res 1992;33:1239-1254.
277. Van der Laarse A. *Cholesterol and myocardial membrane function.* Basic Res Cardiol 1987;82:137-145.
278. Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. *Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans.* J Lipid Res 1993;34:1637-1659.
279. Hodge VJ, Gould SJ, Subramani S, Moser HW, Krisans SK. *Normal cholesterol synthesis in human cells requires functional peroxisomes.* Biochem Biophys Res Commun 1991;181:537-541.
280. Ericsson J, Appelkvist EL, Runquist M, Dallner G. *Biosynthesis of dolichol and cholesterol in rat liver peroxisomes.* Biochimie 1993;75:167-173.
281. Keller GA, Pazirandeh M, Krisans SK. *3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase localization in rat liver peroxisomes and microsomes of control and cholestyramine-treated animals: quantitative biochemical and immunoelectron microscopical analyses.* J Cell Biol 1986;103:875-886.
282. Thompson SL, Krisans SK. *Rat liver peroxisomes catalyze the initial step in cholesterol synthesis.* J Biol Chem 1990;265:5731-5735.

283. Van Amerongen A, Demel RA, Westerman J. *Transfer of cholesterol and oxysterol derivatives by the nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) a study on its mode of action.* Biochim Biophys Acta 1989;1004:36-43.
284. Van Heusden GPH, Van Beckhoven JRCM, Thieringer R, Raetz CRH, Wirtz KWA. *Increased cholesterol synthesis in Chinese hamster ovary cells deficient in peroxisomes.* Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab 1992;1126:81-87.
285. Van Noort M, Rommerts FFG, Van Amerongen A. *Intracellular redistribution of SCP2 in Leydig cells after hormonal stimulation may contribute to increased pregnenolone production.* Biochem Biophys Res Commun 1988;154:60-65.
286. Cleves A, McGee T, Bankaitis V. *Phospholipid transfer proteins: a biological debut.* Trends Cell Biol 1991;1:30-34.
287. Wouters FS, Markman M, De Graaf P, Hauser H, Tabak HF, Wirtz KWA, Moorman AFM. *The immunohistochemical localization of the non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2) in rat small intestine enterocytes.* Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab 1995;1259:192-196.
288. Ashmarina LI, Rusnak N, Mizioroko HM, Mitchell GA. *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase is present in mouse and human liver peroxisomes.* J Biol Chem 1994;269:31929-31932.
289. Biardi L, Sreedhar A, Zokaei A, Vartak NB, Bozeat RL, Shackelford JE, Keller GA, Krisans SK. *Mevalonate kinase is predominantly localized in peroxisomes and is defective in patients with peroxisome deficiency disorders.* J Biol Chem 1994;269:1197-1205.
290. Malle E, Oettl K, Sattler W, Hoefler G, Kostner GM. *Cholesterol biosynthesis in dermal fibroblasts from patients with metabolic disorders of peroxisomal origin.* Eur J Clin Invest 1995;25:59-67.

291. Davignon J, Dufour R, Roy M, Bétard C, Ma Y, Ouellette S, Boulet L, Lussier-Cacan S. *Phenotypic heterogeneity associated with defective apolipoprotein B-100 and occurrence of the familial hypercholesterolemia phenotype in the absence of an LDL-receptor defect within a canadian kindred.* Eur J Epidemiol 1992;8:10-17.
292. Brown MS, Goldstein JL. *Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth.* J Lipid Res 1980;21:505-517.
293. Bjorkhem I, Fausa O, Hopen G. *Role of the 26-hydroxylase in the biosynthesis of bile acids in the normal state and in CTX.* J Clin Invest 1983;71:142-148.
294. Pedersen JJ. *Peroxisomal oxidation of the steroid side chain in bile acid formation.* Biochimie 1993;75:159-165.
295. Natowicz MR, Evans JE, Kelley RI, Moser AB, Watkins PA, Moser HW. *Urinary bile acids and peroxisomal bifunctional enzyme deficiency.* Am J Med Genet 1996;63:356-362.
296. Watkins PA, Chen WW, Harris CJ. *Peroxisomal bifunctional enzyme deficiency.* J Clin Invest 1989;83:771-777.
297. Koibuchi Y, Yamada J, Watanabe T, Kurosawa T, Tohma S, Suga T. *Study on stereospecificity of enzyme reaction related to peroxisomal bile acid synthesis in rat liver.* Chem Pharm Bull (Tokyo) 1992;40:446-448.
298. Une M, Izumi N, Hoshita T. *Stereochemistry of intermediates in the conversion of 3 alpha, 7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5 β -cholestanoic acid to cholic acid by rat liver peroxisomes.* J Biochem (Tokyo) 1993;113:141-143.
299. Rodrigues CM, Kren BT, Steer CJ, Setchell KD. *Formation of Delta²²-bile acids in rats is not gender specific and occurs in the peroxisome.* J Lipid Res 1996;37:540-550.

300. Une M, Konishi H, Yoshii M, Kuramoto T, Hoshita T. *Comparison of side chain oxidation of potential C₂₇-bile acid intermediates between mitochondria and peroxisomes of the rat liver: Presence of β -oxidation activity for bile acid biosynthesis in mitochondria.* J Lipid Res 1996;37:2550-2556.
301. Setchell KDR, Bragetti P, Zimmer-Nechemias L, Daugherty C, Pelli MA, Vaccaro R, Gentili G, Distruitti E, Dozzini G, Morelli A, Clerici C. *Oral bile acid treatment and the patient with Zellweger syndrome.* Hepatology 1992;15:198-207.
302. Kase BF, Prydz K, Bjorkhem I, Pedersen JI. *Conjugation of cholic acid with taurine and glycine by rat liver peroxisomes.* Biochem Biophys Res Commun 1986;138:167-173.
303. Kase BF, Bjorkhem I. *Peroxisomal bile acid-CoA: amino-acid N-acyltransferase in rat liver.* J Biol Chem 1989;264:9220-9223.
304. Kremser K, Kremser-Jezik M, Singh I. *Effect of hypoxia-reoxygenation on peroxisomal functions in cultured human skin fibroblasts from control and Zellweger syndrome patients.* Free Radic Res 1995;22:39-46.
305. Lepage G, Roy CC. *Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction.* J Lipid Res 1986;27:114-120.
306. Wolff JA, Margolis S, Bujdoso-Wolff K, Matusik E, MacLean WC Jr. *Plasma and red blood cell fatty acid composition in children with protein-calorie malnutrition.* Pediatr Res 1984;18:162-167.
307. MacGee J, Williams MG. *Preparation of sphingolipid fatty acid methyl esters for determination by gas-liquid chromatography.* J Chromatogr 1981;205:281-288.
308. Welz W, Sattler W, Ieis HJ, Malle E. *Rapid analysis of non-esterified fatty acids as methyl esters from different biological specimens by gas chromatography after one-step esterification.* J Chromatogr 1990;526:319-329.

309. Martinez M. *Abnormal profiles of polyunsaturated fatty acids in the brain, liver, kidney and retina of patients with peroxisomal disorders.* Brain Res 1992;583:171-182.
310. Wasserhess P, Becker M, Staab D. *Effect of taurine on synthesis of neutral and acidic sterols and fat absorption in preterm and full-term infants.* Am J Clin Nutr 1993;58:349-353.
311. Wong JW, Ebeler SE, Rivkah-Isseroff R, Schibamoto T. *Analysis of malondialdehyde in biological samples by capillary gas chromatography.* Anal Biochem 1994;220:73-81.
312. Sinnhuber RO, Yu TC. *2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products: II. The quantitative determination of malonaldehyde.* Food Tech 1957;12:9-12.
313. Lepage G, Munoz G, Champagne J, Roy CC. *Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography.* Anal Biochem 1991;197:277-283.
314. Gutteridge JMC, Halliwell B. *The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems.* TIBS 1990;15:129-135.
315. Sekas G, Paul HS. *Inhibition of carnitine acyltransferase activities by bile acids in rat liver peroxisomes.* Biochim Biophys Acta 1992;1125:196-202.
316. 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.
317. 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.
318. 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.
319. 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.

320. Parsons HG, Shillabeer G, Rademaker AW. *Early onset of essential fatty acid deficiency in patients with cystic fibrosis receiving a semi-synthetic diet.* J Pediatr 1984;105:958-961.
321. Strandvik B, Bronnegard M, Gilljam H, Carlstedt-Duke J. *Relation between defective regulation of arachidonic acid release and symptoms in cystic fibrosis.* J Gastroenterol 1988;23(suppl 143):1-4.
322. Strandvik B. *Relation between essential fatty acid metabolism and gastrointestinal symptoms in cystic fibrosis.* Acta Paediatr Scand Suppl 1989;363:58-65.
323. Lloyd-Still JD, Johnson SB, Holman RT. *Essential fatty acid status and fluidity of plasma phospholipids in cystic fibrosis infants.* Am J Clin Nutr 1991;54:1029-1035.
324. Levy E, Lepage G, Bendayan M, Ronco N, Thibault L, Galéano N, Smith L, Roy CC. *Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients.* J Lipid Res 1989;30:1197-1209.
325. Carlstedt-Duke J, Bronnegard M, Strandvik B. *Pathological regulation of arachidonic acid release in cystic fibrosis: the putative basic defect.* Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:9202-9206.
326. 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.
327. Kerem E, Reisman J, Corey M, Canny GJ, Levison H. *Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis.* N Engl J Med 1992;326:1187-1191.
328. Corey M, Gaskin K, Durie P, Levison H, Forstner G. *Improved prognosis in CF patients with normal fat absorption.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1984;3 Suppl. 1:S99-S105.
329. Homnick DN, Cox JH, DeLoof MJ, Ringer TV. *Carotenoid levels in normal children and in children with cystic fibrosis.* J Pediatr 1993;122:703-707.
330. Salh B, Webb K, Guyan PM, et al. *Aberrant free radical activity in cystic fibrosis.* Clin Chim Acta 1989;181:65-74.

331. Richard MJ, Aguilaniu B, Arnaud J, Gout JP, Favier A. *Selenium and oxidant injury in patients with cystic fibrosis*. In: Emerit I, Al, eds. *Antioxidants in therapy and preventive medicine*. New York: Plenum Press, 1990:175-178.
332. Lepage G, Kneepkens CMF, Smith L, et al. *Low beta-carotene may contribute to the accumulation of free radicals in cystic fibrosis (CF)*. FASEB J 1991;5:1075 (Abstr).
333. Bilton D, Maddison J, Webb AK, Seabra L, Jones M, Braganza JM. *Cystic fibrosis, breath pentane, and lipid peroxidation*. The Lancet 1991;337:1420.
334. Winklhofer-Roob BM. *Oxygen free radicals and antioxidants in cystic fibrosis: the concept of an oxidant-antioxidant imbalance*. Acta Paediatr 1994;83 (Suppl 395):49-57.
335. Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. *Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis*. J Appl Physiol 1993;75:2419-2424.
336. Langley SC, Brown RK, Kelly FJ. *Reduced free-radical-trapping capacity and altered plasma antioxidant status in cystic fibrosis*. Pediatr Res 1993;33:247-250.
337. Babior BM. *The respiratory burst oxidase*. Trends Biomed Sci 1987;12:241-243.
338. Britigan BE, Roeder TL, Rasmussen GT, Shasby DM, McCormick ML, Cox CD. *Interaction of the Pseudomonas aeruginosa secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells*. J Clin Invest 1992;90:2187-2196.
339. 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.
340. Konstan MW, Byard PJ, Hoppel CL, Davis PB. *Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis*. N Engl J Med 1995;332:848-854.
341. Miele L, Cordella-Miele E, Xing MZ, Frizzell R, Mukherjee AB. *Cystic fibrosis gene mutation (DeltaF₅₀₈) is associated with an intrinsic abnormality in Ca²⁺-induced arachidonic acid release by epithelial cells*. DNA Cell Biol 1997;16:749-759.

342. Burton GW, Ingold KU. *Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant.* Science 1989;224:569-573.
343. Dixon ZR, Burri BJ, Clifford A, et al. *Effects of a carotene-deficient diet on measures of oxidative susceptibility and superoxide dismutase activity in adult women.* Free Rad Biol Med 1994;17:537-544.
344. Sokol RJ, Reardon MC, Accurso FJ, Stall C, Narkewica M, Abman SH, Hammond KB. *Fat-soluble-vitamin status during the first year of life in infants with cystic fibrosis identified by screening of newborns.* Am J Clin Nutr 1989;50:1064-1071.
345. Winklhofer-Roob BM, Ziouzenkova O, Puhl H, Ellemunter H, Greiner P, Müller G, Van't Hof MA, Esterbauer H, Shmerling DH. *Impaired resistance to oxidation of low density lipoprotein in cystic fibrosis: Improvement during vitamin E supplementation.* Free Radic Biol Med 1995;19:725-733.
346. Brown RK, Wyatt H, Price JF, Kelly FJ. *Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress.* Eur Respir J 1996;9:334-339.
347. Winklhofer-Roob BM, Ellemunter H, Frühwirth M, Schlegel-Haueter SE, Khoschsorur G, Van't Hof MA, Shmerling DH. *Plasma vitamin C concentrations in patients with cystic fibrosis: Evidence of associations with lung inflammation.* Am J Clin Nutr 1997;65:1858-1866.
348. Brown RK, Kelly FJ. *Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis.* Pediatr Res 1994;36:487-493.
349. Portal BC, Richard MJ, Faure HS, Hadjian AJ, Favier AE. *Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis.* Am J Clin Nutr 1995;61:843-847.
350. Holsclaw DS. *Cystic fibrosis and pulmonary involvement from multiple perspectives.* Semin Respir Infect 1993;7:141-150.
351. James DR, Alfaham M, Goodchild MC. *Increased susceptibility to peroxide-induced haemolysis with normal vitamin E concentrations in cystic fibrosis.* Clin Chim Acta 1991;204:279-290.

352. Winklhofer-Roob BM, Van't Hof MA, Shmerling D. *Response to oral β -carotene supplementation in patients with cystic fibrosis. A 16-month follow-up study.* Acta Paediatr 1995;84:1132-1136.
353. 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.
354. Strandvik B, Berg U, Kallner A, Kusoffsky E. *Effect of renal function of essential fatty acids supplementation in cystic fibrosis.* J Pediatr 1989;115:242-250.
355. Kemble RJT, Glass HJ, Hillman K, Ratcliffe B. *The protective role of dietary antioxidants (β -carotene) against free radical formation in anaerobes with continued exposure to oxygen.* Cancer Lett. 1997;114:231-232.
356. Winklhofer-Roob BM, Schlegel-Haueter SE, Khoschsorur G, Van't Hof MA, Suter S, Shmerling DH. *Neutrophil elastase α_1 -proteinase inhibitor complex levels decrease in plasma of cystic fibrosis patients during long-term oral β -carotene supplementation.* Pediatr Res 1996;40:130-134.
357. Prabhala RH, Garewal HS, Hicks MJ, Sampliner RE, Watson RR. *The effects of 13-Cis-retinoic acid and beta-carotene on cellular immunity in humans.* Cancer 1991;67:1556-1560.
358. Daudu PA, Kelley DS, Taylor PC, Burri BJ, Wu MM. *Effect of a low β -carotene diet on the immune functions of adult women.* Am J Clin Nutr 1994;60:969-972.
359. Jialal I, Grundy SM. *Effects of dietary supplementation with α -tocopherol on the oxidative modification of low density lipoprotein.* J Lipid Res 1992;33:899-906.
360. Leibovitz B, Hu ML, Tappel AL. *Dietary supplements of vitamin E, β -carotene, coenzyme Q10 and selenium protect tissues against lipid peroxidation in rat tissue slices.* J Nutr 1990;120:97-104.
361. Palozza P, Krinsky NI. *β -carotene and alpha-tocopherol are synergistic antioxidants.* Arch Biochem Biophys 1992;297:184-187.

362. Liebler DC, Stratton SP, Kaysen KL. *Antioxidant actions of β -carotene in liposomal and microsomal membranes: Role of carotenoid-membrane incorporation and α -tocopherol.* Arch Biochem Biophys 1997;338:244-250.
363. Parker RS, Swanson JE, Marmor B, et al. *Study of beta-carotene metabolism in humans using ^{13}C -beta-carotene and high precision isotope ratio mass spectrometry.* Ann NY Acad Sci 1993;691:86-95.
364. Smith FR, Goodman DS. *Vitamin A transport in human vitamin A toxicity.* N Engl J Med 1976;294:805-808.
365. James DR, Owen G, Campbell IA, Goodchild MC. *Vitamin A absorption in cystic fibrosis: risk of hypervitaminosis A.* Gut 1992;33:707-710.
366. Eid NS, Shoemaker LR, Samiec TD. *Vitamin A in cystic fibrosis: case report and review of the literature.* J Pediatr Gastroenterol Nutr 1990;10:265-269.
367. Underwood BA, Dennin CR. *Blood and liver concentrations of vitamins A and E in children with cystic fibrosis of the pancreas.* Pediatr Res 1972;6:26-31.
368. Poupon RE, Ouguerram K, Chretien Y, et al. *Cholesterol-lowering effect of ursodeoxycholic acid in patients with primary biliary cirrhosis.* Hepatology 1993;17:577-582.
369. Eusufzai S, Ericsson S, Cederlund T, Einarsson K, Angelin B. *Effect of ursodeoxychoic acid treatment on ileal absorption of bile acids in man as determined by the Se HCAT test.* Gut 1991;32:1044-1048.
370. Cotting J, Lentze MJ, Reichen J. *Effects of ursodeoxycholic acid treatment on nutrition and liver function in patients with cystic fibrosis and longstanding cholestasis.* Gut 1990;31:918-921.
371. Salen G, Colalillo A, Verga D, Bagan E, Tint GS, Shefer S. *Effect of high and low doses of ursodeoxycholic acid on gallstone dissolution in humans.* Gastroenterology 1980;78:1412-1418.
372. Hardison WGM, Grundy SM. *Effect of ursodeoxycholate and its taurine conjugate on bile acid synthesis and cholesterol absorption.* Gastroenterology 1984;87:130-135.

373. Bouscarel B, Fromm H, Ceryak S, Cassidy MM. *Ursodeoxycholic acid increases low-density lipoprotein binding, uptake and degradation in isolated hamster hepatocytes.* Biochem J 1991;280:589-598.
374. Angelin B, Eusufzai S. *Effects of ursodeoxycholic acid on plasma lipids.* Scand J Gastroenterol 1994;29 Suppl. 204:24-26.
375. Nilsell K, Angelin B, Leijd B, Einersson K. *Comparative effects of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid on bile acid kinetics and biliary lipid secretion in humans: evidence for different modes of action on bile acid synthesis.* Gastroenterology 1983;85:1248-1256.
376. Roda E, Roda A, Sama C, et al. *Effect of ursodeoxycholic acid administration on biliary lipid composition and bile acid kinetics in cholesterol gallstone patients.* Dig Dis Sci 1979;24:123-128.
377. Kraemer R, Rudeberg A, Hadorn B, Rossi E. *Relative underweight in cystic fibrosis and its prognostic value.* Acta Paediatr Scand 1978;67:33-37.
378. Rubin RA, Kowalski TE, Khandelwal M, Malet PF. *Ursodiol for hepatobiliary disorders.* Ann Intern Med 1994;121:207-218.
379. Carreau J-P, Frommel D, Nguyen TT, Mazliak P. *Hepatic delta-9 and delta-6 desaturase activities during the recovery period following carbon tetrachloride poisoning.* Lipids 1980;15:631-636.
380. Segarnick DJ, Cordasco DM, Agura V, Cooper NS, Rotrosen J. *Gamma-linolenic acid inhibits the development of the ethanol-induced fatty liver.* Prostaglandins Leukot Med 1985;17:277-282.
381. Goheen SC, Larkin EC, Manix M. *Dietary arachidonic acid reduces fatty liver, increases diet consumption and weight gain in ethanol-fed rats.* Lipids 1980;15:328-336.
382. Lindblad A, Glaumann H, Strandvik B. *A two-year prospective study of the effect of ursodeoxycholic acid on urinary bile acid excretion and liver morphology in cystic fibrosis-associated liver disease.* Hepatology 1998;27:166-174.

383. Rasmussen M, Michalsen H, Lie SO, Nilsson A, Petersen LB, Norum KR. *Intestinal retinol esterification and serum retinol in children with cystic fibrosis*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1986;5:397-403.
384. Scow RO, Blanchette-Mackie EJ, Smith LC. *Role of capillary endothelium in the clearance of chylomicrons: a model for lipid transport from blood by lateral diffusion in cell membranes*. Circ Res 1976;39:149-156.
385. Rayner RJ, Tyrrel JC, Hiller EJ, et al. *Night blindness and conjunctival xerosis caused by vitamin A in patients with cystic fibrosis*. Arch Dis Child 1989;64:1151-1156.
386. Duggan C, Colin AA, Agil A, Higgins L, Rifai N. *Vitamin A status in acute exacerbations of cystic fibrosis*. Am J Clin Nutr 1996;64:635-639.
387. Smith FR, Underwood BA, Denning CR, Varma A, Goodman DS. *Depressed plasma retinol-binding protein levels in cystic fibrosis*. J Lab Clin Med 1978;80:423-433.
388. Sarles J, Scheiner C, Sarran M, Giraud F. *Hepatic hypervitaminosis A: a familial observation*. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1990;10:71-77.
389. Boeynaems J-M, Panneels V, Van Sande J, Braekman J-C. *Un rôle physiologique des plasmalogènes: la protection contre le stress oxydatif et l'excès d'iode*. Médecine/Sciences 1995;11:254-259.
390. De Craemer D, Pauwels M, Van Den Branden C. *Alterations of peroxisomes in steatosis and the human liver: A quantitative study*. Hepatology 1995;22:744-752.
391. Aw TY, Williams MW. *Intestinal absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids in rats: effect of exogenous GSH*. Am J Physiol 1992;263:G665-672.
392. Kanazawa K, Kanazawa E, Natake M. *Uptake of secondary autooxidation products of linoleic acid by the rat*. Lipids 1985;20:412-419.
393. Gaginella TS, Kachur JF, Tamai H, Keshavarzian A. *Reactive oxygen and nitrogen metabolites as mediators of secretory diarrhea*. Gastroenterology 1995;109:2019-2028.

394. Lindley KJ, Goss-Sampson MA, Muller DPR, Milla PJ. *Lipid peroxidation and electrogenic ion transport in the jejunum of the vitamin E deficient rat.* Gut 1994;35:34-39.
395. Mathias JR, Clench MH. *Review: pathophysiology of diarrhea caused by bacterial overgrowth of the small intestine.* Am J Med Sci 1985;289:243-248.
396. Yamanaka WK, Clemans GW, Hutchinson ML. *Essential fatty acid deficiency in humans.* Prog Lipid Res 1981;19:187-215.
397. Clarke SD, Jump DB. *Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription.* Annu Rev Nutr 1994;14:83-98.
398. Levy E, Thibault L, Garofalo C, et al. *Combined (n-3 and n-6) essential fatty acid deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition, and lipolytic enzymes.* J Lipid Res 1990;31:2009-2017.
399. Sanders TAB. *Nutritional aspects of rancidity.* In *Rancidity in Foods.* Elsevier. 1989:125-139.
400. Draper HH, Polensek L, Hadley M, McGirr LG. *Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues.* Lipids 1984;19:836-843.
401. Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Feingold KR. *Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats.* J Lipid Res 1996;37:420-430.
402. Kanazawa K, Ashida H. *Target enzymes on hepatic dysfunction caused by dietary products of lipid peroxidation.* Arch Biochem Biophys 1991;288:71-78.
403. Izaki Y, Yoshikawa S, Uchiyama M. *Effect of ingestion of thermally oxidized frying oil on peroxidative criteria in rats.* Lipids 1984;19:324-331.
404. Liu JF, Huang CJ. *Tissue α -tocopherol retention in male rats is compromised by feeding diets containing oxidized frying oil.* J Nutr 1995;125:3071-3080.
405. Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell-Keely PT, Duncan MW, Ames BN. *γ -tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO_x and*

- complements α -tocopherol: Physiological implications.* Proc Natl Acad Sci USA 1997;94:3217-3222.
406. Kubow S. *Lipid oxidation products in food and atherogenesis.* Nutr Rev 1993;51:33-40.
407. Esterbauer H, Cheeseman KH. *Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal.* Meth Enzymol 1990;186:407-421.
408. Cai Y, Sohlenius A-K, Anderson K, Sundberg C, De Pierre JW. *Effects of acetylsalicylic acid on parameters related to peroxisome proliferation in mouse liver.* Biochem Pharmacol 1994;47:2213-2219.
409. Singh H, Beckman K, Poulos A. *Peroxisomal β -oxidation of branched chain fatty acids in rat liver.* Evidence that carnitine palmitoyltransferase I prevents transport of branched chain fatty acids into mitochondria. J Biol Chem 1994;269:9514-9520.
410. Inoue I, Noji S, Shen MZ, Takahashi K, Katayama S. *The peroxisome proliferator-activated receptor $_{\alpha}$ (PPAR $_{\alpha}$) regulates the plasma thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) level.* Biochem Biophys Res Commun 1997;237:606-610.
411. Ito A, Watanabe H, Naito M, Naito Y. *Induction of duodenal tumors in mice by oral administration of hydrogen peroxide,* Gann 1981;72:174-175.
412. Lazarow PB, de Duve C. *A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes: enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug.* Proc Natl Acad Sci USA 1976;73:2043-2046.
413. Wilcke M, Hultenby K, Alexson SEH. *Novel peroxisomal populations in subcellular fractions from rat liver.* Implications for peroxisome structure and biogenesis. J Biol Chem 1995;270:6949-6958.
414. Reddy JK, Lalwani ND. *Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans.* Crit Rev Toxicol 1983;12:1-58.

415. Demoz A, Willumsen N, Berge RK. *Eicosapentaenoic acid at hypotriglyceridemic dose enhances the hepatic antioxidant defense in mice.* Lipids 1992;27:968-971.
416. Kaikaus RM, Chan WK, Lysenko N, Ray R, de Montellano PRO, Bass NM. *Induction of peroxisomal fatty acid β -oxidation and liver fatty acid-binding protein by peroxisome proliferators.* J Biol Chem 1993;268:9593-9603.
417. De Craemer D, Vamecq J, Roels F, Vallée L, Pauwels M, Van Den Branden C. *Peroxisomes in liver, heart, and kidney of mice fed a commercial fish oil preparation: Original data and review on peroxisomal changes induced by high-fat diets.* J Lipid Res 1994;35:1241-1250.
418. Reddy JK, Lalwani ND, Dabholkar AS, Reddy MK, Qureshi SA. *Increased peroxisomal activity in the liver of vitamin E deficient rats.* Biochem Int 1981;3:41-49.
419. Reddy JK, Lalwani ND, Reddy MK, Qureshi SA. *Excessive accumulation of autofluorescent lipofuscin in the liver during hepatocarcinogenesis by methyl clofenapate and other hypolipidemic peroxisome proliferators.* Cancer Res 1982;42:259-266.
420. Matkovics B, Gyurkovits K, Laszlo A, Szabo L. *Altered peroxide metabolism in erythrocytes from children with cystic fibrosis.* Clin Chim Acta 1982;125:59-62.

APPENDICE 1

**Caractéristiques cliniques de patients atteints de fibrose kystique du pancréas
(étude pilote)**

APPENDICE 1

Caractéristiques cliniques de patients atteints de fibrose kystique du pancréas
(étude pilote)

| | Valeurs normales | FKP Normaux en AGE (10) | FKP Déficients en AGE (7) |
|---------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| Age (an) | 10 à 16 | 11.6±0.6 | 13.9±1.7 |
| Poids (score Z) | 0 | -0.61±0.32 | -1.22±0.30 |
| Taille (score Z) | 0 | -0.40±0.38 | -1.66±0.32* |
| Score clinique de Schawchman | 100 | 80.0±3.4 | 71.9±4.6 |
| Lipides fécaux (g/24 h) | <5 | 10.5±2.5 | 21.1±5.5* |
| 20:3n-9/20:4n-6 | <0.035 | 0.029±0.003 | 0.216±0.103* |
| Vitamine E/ triglycérides | 0.009-0.019 | 0.011±0.001 | 0.005±0.001* |
| Bilirubine (mg/dL) | <0.80 | 0.20±0.05 | 0.40±0.06* |
| ALT (U/L) | <35 | 15.4±2.4 | 37.4±17.9* |
| γGT (U/L) | <45 | 10.5±1.5 | 43.7±10.6* |

Moyenne ± erreur type

* P<0.05 (test de t)

20:3n-9/20:4n-6 est le paramètre ayant servi à séparer les 2 groupes de patients.

APPENDICE 2

Acides gras à chaîne très longue et index des plasmalogènes chez des patients atteints de fibrose kystique du pancréas (étude pilote)

APPENDICE 2

Acides gras à chaîne très longue et index des plasmalogènes chez des patients atteints de fibrose kystique du pancréas (étude pilote)

| | Témoins (11) | FKP Normaux en AGE (10) | FKP Déficients en AGE (7) |
|-----------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| C24:0/C22:0 | 1.75±0.06 | 1.88±0.09 | 2.70±0.18* |
| C18:0 DMA/C18:0 | 1.21±0.04 | 1.11±0.04 | 0.98±0.08* |

Moyenne ± erreur type

* Différent des deux autres groupes (ANOVA)

Les acides gras ont été analysés dans la fraction phosphatidyléthanolamine des globules rouges par chromatographie gazeuse, après avoir séparé la fraction phosphatidyléthanolamine par chromatographie sur couche mince et l'avoir transestérifiée.

APPENDICE 3

Déficiencia en ácidos grasos esenciales según el marcador $20:3n-9/20:4n-6$

APPENDICE 3

Déficiência en acides gras essentiels selon le marqueur 20:3n-9/20:4n-6

| | Témoins (12) | Restreints en AGE (12) | Déficients en AGE (12) |
|---------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
| PL du foie | 0.23±0.01 | 4.25±0.38* | 30.88±2.80* |
| PL du cœur | 0.36±0.03 | 4.45±0.70* | 28.78±2.29* |
| PL du cerveau | 0.86±0.03 | 3.62±0.54* | 9.11±0.48* |

Moyenne ± erreur type

* P<0.05, différent des 2 autres groupes (ANOVA).

Les résultats sont exprimés en 20:3n-9/20:4n-6 (%).

Homogénats de tissus de rats après 9 semaines de diètes différentes par leurs acides gras essentiels. Les phospholipides (PL) des tissus ont été analysés par chromatographie gazeuse après avoir séparé les PL par chromatographie sur couche mince et avoir transestérifié ces PL.

APPENDICE 4

Acides gras à chaîne très longue et marqueur des plasmalogènes

APPENDICE 4

Acides gras à chaîne très longue et marqueur des plasmalogènes

| | Témoins (12) | Restreints en AGE (12) | Déficients en AGE (12) |
|---------------|-----------------|------------------------------|------------------------------|
| 24:0/22:0 | | | |
| PL du foie | 2.75±0.07 | 2.48±0.10 | 2.50±0.10 |
| PL du cœur | 0.94±0.04 | 1.13±0.06 | 1.25±0.11* |
| PL du cerveau | 1.68±0.04 | 1.59±0.02 | 1.68±0.04 |
| 18:0 DMA/18:0 | | | |
| PL du foie | 0.81±0.03 | 0.75±0.03 | 0.68±0.02* |
| PL du cœur | 4.74±0.08 | 5.14±0.16 | 4.78±0.17 |
| PL du cerveau | 25.99±0.21 | 26.29±0.26 | 26.21±0.19 |

Moyenne ± erreur type

* P<0.05, différent des 2 autres groupes (ANOVA).

Homogénats de tissus de rats après 9 semaines de diètes différentes par leurs acides gras essentiels. Les phospholipides (PL) des tissus ont été analysés.

| |
|---------|
| Mémoire |
|---------|

1. Effet de la déficience en acides gras essentiels sur la fonction peroxysomiale. M.Sc., Université de Montréal, Faculté de Médecine, 1992.

| |
|---------------------------------------------------------|
| Articles originaux dans des revues avec comité de pairs |
|---------------------------------------------------------|

1. Roy CC, Weber AM, Chartrand L, **Lepage G**, Morin CL, Lasalle R. Bile acid metabolism in cystic fibrosis. Proceedings of the 7th International Cystic Fibrosis Congress, Paris, May 1976, pp. 478-484.
2. **Lepage G**, Fontaine A, Roy CC. Vulnerability of keto bile acids to alkaline hydrolysis. *J Lipid Res* 1978;19:505-509.
3. Roy CC, Lefebvre D, Bélanger G, Chartrand L, **Lepage G**, Weber A. The effect of lipids on taurocholate absorption from the rat small intestine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979;161:105-110.
4. Roy CC, Roulet M, Lefebvre D, Chartrand L, **Lepage G**, Fournier LA. The role of gastric lipolysis on fat absorption and bile acid metabolism in the rat. *Lipids* 1979;14(9):811-815.
5. Roulet M, Weber AM, Roy CC, Chartrand L, Fournier LA, **Lepage G**, Lasalle R, Morin CL. Increased gastric lipolytic activity in cystic fibrosis. Proceedings of the 8th International Congress on Cystic Fibrosis, Toronto, May 1980, pp. 172-176.
6. **Lepage G**, Roy CC, Weber AM. Separation of sulfated from non-sulfated serum bile acids without the use of Sephadex columns. *J Lipid Res* 1981;22:705-711.
7. Roy CC, Weber AM, Morin CL, **Lepage G**, Brisson G, Yousef IM, Lasalle R. Hepatobiliary disease in cystic fibrosis: A survey of current issues and concepts. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1982;1:469-478.
8. Roy CC, Fournier LA, Chartrand L, **Lepage G**, Yousef I. Effect of diversion of pancreatic secretions on biliary lipids and bile salt kinetics in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1983;2:152-159.
9. **Lepage G**, Collet S, Bouglé D, Kien LC, Lepage D, Dallaire L, Darling P, Roy CC. The composition of preterm milk in relation to the degree of prematurity. *Am J Clin Nutr* 1984;40:1042-1049.

10. **Lepage G, Roy CC.** Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J Lipid Res* 1984;25:1391-1396.
11. **Darling PB, Lepage G, Tremblay P, Collet S, Kien LC, Roy CC.** Protein quality and quantity in preterm infants on the same energy intake. *Am J Dis Child* 1985;139:186-190.
12. **Darling PB, Lepage G, Leroy C, Masson P, Roy CC.** Effect of taurine supplements on fat absorption in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1985;19:578-582.
13. **Lepage G, Roy CC.** Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986;27:114-120.
14. **Leroy C, Lepage G, Morin CL, Bertrand JM, Larue-Dufour O, Roy CC.** Effect of dietary fat and residues on fecal loss of sterols and on their microbial degradation in cystic fibrosis. *Dig Dis Sci* 1986;31:911-918.
15. **Belli D, Fournier LA, Lepage G, Yousef I, Weber AM, Tuchweber B, Roy CC.** TPN-associated cholestasis in rats: comparison of different amino acid mixtures with regard to their cholestatic potential. *JPEN* 1987;11:67-73.
16. **Sarda P, Lepage G, Roy CC, Chessex P.** Storage of medium-chain triglycerides in adipose tissue of orally fed infants. *Am J Clin Nutr* 1987;45:399-405.
17. **Galeano NF, Darling P, Lepage G, Leroy C, Collet S, Giguère R, Roy CC.** Taurine supplementation of a premature formula improves fat absorption in preterm infants. *Ped Res* 1987;22:67-71.
18. **Levy E, Letarte J, Lepage G, Thibault L, Roy CC.** Plasma and lipoprotein fatty acid composition in glycogen storage disease type I. *Lipids* 1987;22:381-385.
19. **Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, Lepage G, Seidman E, Bendayan M, Leroy C, Roy CC.** Intestinal apo B synthesis, lipids and lipoproteins in chylomicron retention disease. *J Lipid Res* 1987;28:1263-1274.
20. **Belli DC, Levy E, Darling P, Leroy C, Lepage G, Giguère R, Roy CC.** Taurine improves the absorption of a fat meal in cystic fibrosis patients. *Pediatrics* 1987;80:517-523.
21. **Galeano NF, Lepage G, Leroy C, Belli D, Levy E, Roy CC.** Comparison of two special infant formulas designed for the treatment of protracted diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7:76-83.

22. **Lepage G, Roy CC.** Fecal bile acids as a means of assessing the integrity of the enterohepatic circulation of bile acids and their microbial degradation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7:6-9.
23. Levy E, Thibault LA, Roy CC, Bendayan M, **Lepage G**, Letarte J. Circulating lipids and lipoproteins in glycogen storage type I with nocturnal intragastric feeding. *J Lipid Res* 1988;29:215-226.
24. Belli DC, Fournier LA, **Lepage G**, Yousef IM, Roy CC. The influence of taurine on the bile acid maximum secretory rate in the guinea pig. *Pediatr Res* 1988;24:34-37.
25. **Lepage G, Roy CC.** Specific methylation of plasma non-esterified fatty acids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1988;29:227-235.
26. Levy E, Roy CC, **Lepage G**, Bendayan M. Lipid abnormalities in pancreatic tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Lipids* 1988;23:771-778.
27. 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.
28. Levy E, Seidman E, Letarte J, Thibault L, **Lepage G**, Roy CC. Hyperlipoproteinemia in glycogen storage disease type I: effect of nocturnal intragastric feeding. In *Lipid storage disorders: biological and medical aspects*, edited by R Salvayre, L Douste-Blazy and S Gatt, Life Sciences Vol. 150, pp. 741-747, 1988.
29. Pineault M, **Lepage G**, Bisailon S, Roy CC, Chessex P. Total parenteral nutrition in the newborn: energy substrates and plasma total fatty acids. *Pediatr Res* 1989;26:290-293.
30. Levy E, **Lepage G**, Bendayan M, Ronco N, Thibault L, Galeano N, Smith L, Roy CC. Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *J Lipid Res* 1989;30:1197-1209.
31. **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.
32. Roy CC, **Lepage G**, Levy E. Alteraciones Clinicas Y Experimentales De La Sintesis Y Secretion De Quilomicrones. In: *Advances En Nutricion De La Infancia* 3, pp. 27-45, 1989.
33. Levy J, De Felice A, **Lepage G**. Essential fatty acid deficiency mimicking porphyria cutanea tarda in a patient with chronic cholestasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;10:242-245.

34. Levy E, Thibault L, Garofalo C, Messier M, **Lepage G**, Ronco N, Roy CC. Combined (n3- and n-6) essential fatty acid deficiency is a potent modulator of plasma lipids, lipoprotein composition and lipolytic enzymes. *J Lipid Res* 1990;31:2009-2017.
35. **Lepage G**, Munoz G, Champagne J, Roy CC. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1991;197:277-283.
36. Levy E, Rouleau T, **Lepage G**, Smith L, Junien JL, Roy CC. Partially purified rabbit gastric lipase: In vitro and in vivo experiments to assess its potential contribution to gastric and intestinal lipolysis. *Nutrition Research* 1991;11:607-619.
37. 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.
38. Guertin F, Roy CC, **Lepage G**, Perea A, Giguère R, Yousef I, Tuchweber B. Effect of taurine on total parenteral nutrition-associated cholestasis. *JPEN* 1991;15:247-251.
39. Levy E, Garofalo C, Thibault L, Dionne S, Daoust L, **Lepage G**, Roy CC. Intraluminal and intracellular phases of fat absorption are impaired in essential fatty acid deficiency. *Am J Physiol* 1992;262:G319-G326.
40. Kneepkens CMF, Ferreira C, **Lepage G**, Roy CC. The hydrocarbon breath test in the study of lipid peroxidation: principles and practice. *Clin Invest Med* 1992;15:163-186.
41. Levy E, Thibault L, Turgeon J, Roy CC, Gurbindo C, **Lepage G**, Godard M, Rivard GE, Seidman E. Beneficial effects of fish oil supplements on lipids, lipoproteins and lipoprotein lipase in patients with glycogen storage disease type I. *Am J Clin Nutr* 1993;57:922-929.
42. Levy E, Roy CC, Lacaille F, Lambert M, Messier M, Gavino V, **Lepage G**, 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* 1993;57:573-579.
43. **Lepage G**, Kneepkens CMF, Roy CC. Dysfonction peroxysomiale associée à la déficience en acides gras essentiels. *Médecine-Sciences* 1993;9:571-576.
44. Guertin F, Roy CC, **Lepage G**, Yousef I, Tuchweber B. Liver membrane composition after short term parenteral nutrition with and without taurine in guinea pigs: the effect of taurine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993;203:418-423.

45. Kneepkens CMF, **Lepage G**, Roy CC. Role of beta-carotene in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1993;Suppl 9:169-170.
46. Levy E, Gurbindo C, Lacaille F, Paradis K, Thibault L, **Lepage G**, Seidman E. Circulating tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels and lipid abnormalities in patients with cystic fibrosis. *Pediatric Research* 1993;34:162-166.
47. Belli DC, Fournier LA, **Lepage G**, Yousef I, Roy CC. S-adenosylmethionine prevents total parenteral nutrition-induced cholestasis in the rat. *J Hepatol* 1994;21:18-23.
48. Kneepkens CMF, **Lepage G**, Roy CC. The potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1994;17:127-160.
49. Tanguay M, **Lepage G**, Blaise G, Garceau D, Dumont L. Clentiazem, diltiazem and cold cardioplegia in isolated ischemic rabbit hearts: Relation between additive cardioprotection, physicochemical properties and preservation of myocardial lipid components. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;24:950-959.
50. Guertin F, Loranger A, **Lepage G**, Roy CC, Yousef IM, Domingo N, Chanussot F, Lafont H, Tuchweber B. Bile formation and hepatic plasma membrane composition in guinea-pigs and rats. *Comp Biochem Physiol* 1995;111B:523-531.
51. **Lepage G**, Champagne J, Ronco N, Lamarre A, Osberg I, Sokol RJ, Roy CC. Supplementation with carotenoids corrects increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1996;64:87-93.
52. Justinich C, Katz A, Gurbindo C, **Lepage G**, Chad Z, Bouthillier L, Seidman E. Elemental diet improves steroid-dependent eosinophilic gastroenteritis and reverses growth failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996;23:81-85.
53. **Lepage G**, Roy CC. Reply to BM Winklhofer-Roob. *Am J Clin Nutr* 1997;65:576-577.
54. **Lepage G**, Paradis K, Lacaille F, Sénéchal L, Ronco N, Champagne J, Lenaerts C, Roy CC, Rasquin-Weber A. Ursodeoxycholic acid improves the hepatic metabolism of essential fatty acids and retinol in children with cystic fibrosis. *J Pediatr*, 1997;130:52-58.
55. Fayon M, Lacroix J, Champagne J, **Lepage G**, Chartrand C, Vobecky S, Farrell CA, Delvin E. The influence of ischemia-reperfusion injury on plasma malondialdehyde in children undergoing cardiopulmonary bypass. *J Intens Care Med*, 1998;13:44-52.

56. Yandza T, Manika A, Huynh Th, Lavoie JC, Champagne J, **Lepage G**, Chessex Ph, Busque S, Proulx F. Glutathion intra-hépatique et stress oxydatif en transplantation du foie chez le cochon. *Ann Chir*, 1997;51 (In Press).
57. Lands LC, Hornby L, Champagne J, **Lepage G**. Plasma malondialdehyde responses to short-term high intensity and progressive exercise. *J Appl Physiol*, 1997 (Submitted).
58. **Lepage G**, Ronco N, Champagne J, Roy CC. Exogenous lipid peroxidation products alter the structure and function of peroxisomes. *Am J Clin Nutr*, 1997 (Submitted).
59. Herzog D, **Lepage G**, Levy E, Roy CC, Bouthillier L, Seidman EG. Essential fatty acid sufficient elemental diet therapy in pediatric Crohn's disease: effect on nutritional and inflammatory parameters. *Nutrition* 1997 (Submitted).
60. Spalinger JH, Seidman EG, **Lepage G**, Ménard D, Gavino V, Levy E. Uptake and metabolism of a structured triglyceride by Caco-2 cells: reversal of essential fatty acid deficiency. *Am J Physiol* 1998 (Submitted).

Communications

1. Weber AM, Tuchweber B, Roy CC, **Lepage G**, Brochu P, Yousef IM, Turgeon C, Gabbiani G, Morin CL. Neonatal intrahepatic cholestasis in North American Indians: A new entity? American Association for the Study of Liver Diseases, 1979.
2. Roy CC, **Lepage G**, Chartrand L, Fontaine A. Early postnatal nutrition and later growth of low birth weight newborns. American Pediatric Society, 1979.
3. Roulet M, Weber A, Roy CC, Chartrand L, **Lepage G**, Lasalle R, Morin CL. Increased gastric lipolytic activity in cystic fibrosis. 8th International Congress on Cystic Fibrosis, 1979.
4. Roy CC, **Lepage G**. Fat absorption with special reference to the fatty acid composition in low birthweight infants. Congrès International de Pédiatrie, 1980.
5. Weber AM, Tuchweber B, **Lepage G**, Yousef I, Roy CC, Morin CL. Serum bile acid (BA) profile and liver ultrastructure in familial and other pediatric cholestatic syndromes. American Association for the Study of Liver Diseases, 1980.
6. Fontaine A, Roy CC, **Lepage G**, Chartrand L, Morin CL, Weber AM. The extent of microbial degradation of bile acids: An important factor modulating their absorption. Society for Pediatric Research, 1980.
7. Bouglé D, **Lepage G**, Lepage D, Melançon SB, Roy CC. Profil des acides aminés dans la fraction non protéique du lait préterme. Société Canadienne de Pédiatrie, 1981.
8. Roy CC, Fournier LA, Chartrand L, **Lepage G**. Increased secretion rate of lecithin in experimental pancreatic insufficiency. Society for Pediatric Research, 1981.
9. Bouglé D, **Lepage G**, Melançon SB, Collet S, Roy CC. Effect of gestational and postpartum age on the nitrogen composition of breast milk. American Pediatric Society, 1981.
10. **Lepage G**, Collet S, Bouglé D, Darling P, Roy CC. Effect of gestational and postpartum age on the nitrogen and lipid composition of breast milk. Canadian Pediatric Society, 1983.
11. Darling P, **Lepage G**, Tremblay P, Roy CC. Whey predominant and casein hydrolysate formulas in low birthweight infants. Canadian Pediatric Society, 1983.

12. **Lepage G**, Collet S, Bouglé D, Kien LC, Lepage D, Dallaire L, Darling P, Roy CC. The composition of preterm milk in relation to the degree of prematurity. Society for Pediatric Research, 1984.
13. Darling P, **Lepage G**, Tremblay P, Collet S, Kien LC, Roy CC. Protein quality and quantity in preterm infants on the same energy intake. American Pediatric Society, 1984.
14. Sarda P, **Lepage G**, Chessex P, Roy CC. Storage of medium chain triglycerides (MCT) in adipose tissue of formula fed infants. Society for Pediatric Research, 1984.
15. Roy CC, Leroy C, **Lepage G**, Morin CL, Lasalle R, Bertrand JM. Bile acid loss in cystic fibrosis: The role of residues. American Gastroenterological Association, 1984.
16. Roy CC, Fournier LA, **Lepage G**, Weber AM, Tuchweber B, Yousef I. Prevention of TPN associated cholestasis by a methyl donor amino acid in the rat. American Gastroenterological Association, 1984.
17. Belli D, Fournier LA, Leroy C, **Lepage G**, Tuchweber B, Weber A, Yousef I, Roy CC. TPN-associated cholestasis: Hepatocyte membrane changes induced by amino acids. Clinical and Investigative Medicine, 1984.
18. Darling P, **Lepage G**, Leroy C, Masson P, Roy CC. Taurine supplements improve fat absorption in patients with cystic fibrosis. Society for Pediatric Research, 1985.
19. Darling P, **Lepage G**, Tremblay P, Collet S, Roy CC. Protein quality and quantity in preterm infants on the same energy intake. IVE Congrès International d'Auxologie, 1985.
20. **Lepage G**, Roy CC. Improved recovery of all lipid classes in a one-step reaction involving direct transesterification. Federation of American Societies for Experimental Biology, 1986.
21. Galeano NF, Darling P, **Lepage G**, Collet S, Giguère R, Roy CC. Taurine supplementation improves fat absorption in LBW infants. Royal College of Physicians and Surgeons, 1986.
22. **Lepage G**, Roy CC. Specific methylation of free fatty acids directly on plasma in a one step reaction. American Oil Chemists' Society, 1986.
23. Levy E, Deckelbaum R, **Lepage G**, Letarte J, Brochu P, Weber AM, Morin CL, Marcel Y, Roy CC. Chylomicron retention disease (Anderson's disease): A disorder associated with an abnormal lipoprotein lipid composition and a normal complement of apoproteins. American Gastroenterological Association, 1986.

24. Levy E, Deckelbaum R, **Lepage G**, Letarte J, Brochu P, Weber AM, Morin CL, Marcel Y, Roy CC. Chylomicron retention disease (Anderson's disease): A disorder associated with an abnormal lipoprotein lipid composition and a normal complement of apoproteins. Pediatric Gastroenterology Mead Johnson Research Conference, 1986.
25. Belli DC, Levy E, Darling P, **Lepage G**, Leroy C, Roy CC. Taurine increases post-prandial chylomicronemia in CF on pancreatic enzymes. American Gastroenterological Association, 1986.
26. Levy E, Deckelbaum R, **Lepage G**, Weber AM, Morin CL, Marcel Y, Roy CC. Is chylomicron retention disease (Anderson's disease) associated with a disorder of the assembly or the transport of chylomicrons? The World Congress of Gastroenterology, 1986.
27. Levy E, Deckelbaum R, **Lepage G**, Weber AM, Morin CL, Marcel Y, Roy CC. Is chylomicron retention disease associated with a disorder of the assembly or the transport of chylomicrons? The Annual Meeting of the Royal college, Canadian Society for Clinical Investigation, 1986.
28. Pineault M, **Lepage G**, Bisailon S, Roy CC, Chessex P. Influence of glucose and fat on essential fatty acids (EFA) metabolism. APS/SPR, 1987.
29. Galéano N, Belli D, Darling P, **Lepage G**, Levy E, Leroy C, Roy CC. La taurine améliore l'absorption des lipides chez le prématuré et l'enfant atteint de mucoviscidose. Congrès conjoint de la Société Canadienne de Pédiatrie et l'Association des Pédiatres de Langue Française, Juillet 1987.
30. **Lepage G**, Roy CC. Specific methylation of plasma non-esterified fatty acids in a one-step reaction. Federation of American Societies for Experimental Biology, 1987.
31. Belli D, Levy E, Darling P, **Lepage G**, Roy CC. Taurine improves fat absorption in CF on pancreatic enzymes. Oslo, June 1987.
32. Guertin F, **Lepage G**, Roy CC. Effect of taurine on cholestasis induced by amino acid dextrose infusion in guinea pigs. Federation of American Societies for Experimental Biology, 1987.
33. 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. Federation of American Societies for Experimental Biology, 1987.
34. Levy E, Letarte J, **Lepage G**, Thibault L, Roy CC. Plasma and lipoprotein fatty acid and composition in glycogen storage disease type I. Federation of American Societies for Experimental Biology, 1987.

35. Levy E, Letarte J, Thibault L, **Lepage G**, Seidman E, Roy CC. Disorders in lipids and lipoproteins in glycogen storage disease type I. North American Society for Pediatric Gastroenterology, Chicago, Octobre 1987.
36. Levy E, Marcel Y, Deckelbaum RJ, Milne R, **Lepage G**, Seidman E, Bendayan M, Roy CC. Intestinal apo B synthesis, lipids and lipoproteins in chylomicron retention disease. North American Society for Pediatric Gastroenterology, Chicago, Octobre 1987.
37. Galeano N, Belli D, Darling P, **Lepage G**, Levy E, Roy CC. Taurine improves fat absorption in prematures and in cystic fibrosis. North American Society for Pediatric Gastroenterology, Chicago, Octobre 1987.
38. Levy E, Letarte J, Thibault L, **Lepage G**, Seidman E, Roy CC. Disorders in lipids and lipoproteins in glycogen storage disease type I. Nato advanced research workshop and Inserm symposium lipid storage disorders, France, 1987.
39. **Lepage G**, Ronco N, Rouleau T, Rivard GE, Smith L, Galeano N, Levy E, Roy CC. Essential fatty acid deficiency is associated with decreased platelet aggregation in CF. Society for Pediatric Research, May 1988.
40. **Lepage G**, Ronco N, Smith L, Galeano N, Levy E, Roy CC. Are tissue lipids necessary to establish the diagnosis of EFA deficiency in CF? Federation of American Societies for Experimental Biology, May 1988.
41. Smith L, **Lepage G**, Ronco N, Galeano N, Levy E, Roy CC. Essential fatty acid deficiency, tissue lipids and platelet hypoaggregability in CF. Pediatric Gastroenterology Mead Johnson Conference, March 1988.
42. Levy E, Roy CC, **Lepage G**, Bendayan M. Lipid abnormalities in pancreatic tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. Federation of American Societies for Experimental Biology, May 1988.
43. Levy E, Thibault L, Seidman E, Deckelbaum R, Olivecrona T, **Lepage G**, Letarte J, Roy CC. Remodeling of plasma lipoproteins in hyperlipemic disorders. Federation of American Societies for Experimental Biology, May 1988.
44. **Lepage G**, Levy E, Ronco N, Smith L, Galeano N, Roy CC. Essential fatty acid deficiency is associated with altered tissue membrane composition and platelet function in CF. Canadian Society for Clinical Investigation, 1988.
45. Levy E, Thibault L, Seidman E, Deckelbaum R, Olivecrona T, **Lepage G**, Roy CC. Lipoprotein lipase remodeling of plasma lipoproteins in hyperlipidemic disorders. American Heart Association, November 1988.

46. **Lepage G**, Levy E, Ronco N, Smith L, Galeano N, Roy CC. High incidence of essential fatty acid deficiency based on the direct transesterification of plasma, red cell and platelet fatty acids in CF. North American Society for Pediatric Gastroenterology, November 1988.
47. Levy E, **Lepage G**, Bendayan M, Ronco N, Thibault L, Galeano N, Smith L, Roy CC. Decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities in CF: Their relationship to essential fatty acid deficiency. North American Society for Pediatric Gastroenterology, November 1988.
48. **Lepage G**, Levy E, Thibault L, Seidman E, Ronco N, Roy CC. Essential fatty acid deficiency in GSD-I treated with a nocturnal fat-free elemental formula. Federation of American Societies for Experimental Biology. FASEB J 1989;3:A944.
49. Levy E, **Lepage G**, Bendayan M, Ronco N, Thibault L, Galeano N, Smith L, Roy CC. Lipoprotein metabolism in cystic fibrosis: role of essential fatty acid deficiency. American Gastroenterological Association, May 1989.
50. Levy J, De Felice A, **Lepage G**. Essential fatty acid deficiency mimicking porphyria cutanea tarda in a patient with chronic cholestasis. North American Society for Pediatric Gastroenterology Association, May 1989.
51. **Lepage G**, Munoz G, Roy CC. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by the thiobarbituric acid reaction. Federation of American Societies for Experimental Biology. FASEB J 1990;4:A628.
52. Guertin F, Roy CC, **Lepage G**, Perea A, Giguère R, Yousef I, Tuchweber B. The addition of taurine to an amino acid solution prevents TPN-induced cholestasis in the guinea pig. North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition, June 1990.
53. Lacaille F, Smith L, **Lepage G**, Ronco N, Lamarre A, Levy E, Roy CC. The severity of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis is related to steatorrhea rather than to nutritional status. North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition, June 1990.
54. Levy E, **Lepage G**, Thibault L, Ronco N, Smith L, Roy CC. Decreased lipoprotein lipase activity and lipoprotein abnormalities in essential fatty acid deficiency. Royal College of Physicians and Surgeons, September 1990.
55. **Lepage G**, Kneepkens CMF, Smith L, Lacaille F, Ronco N, Champagne J, Osberg I, Roy CC. Low beta-carotene may contribute to the accumulation of free radicals in cystic fibrosis (CF). Federation of American Societies for Experimental Biology. FASEB J 1991;5:A1075.

56. Kneepkens CMF, **Lepage G**, Smith L, Lacaille F, Ronco N, Champagne J, Lamarre A, Osberg I, Roy CC. Low beta-carotene may contribute to the accumulation of free radicals in cystic fibrosis (CF). *Pediatr Res* 1991;29:106A.
57. Kneepkens CMF, Ferreira C, **Lepage G**, Roy CC. De Koolwaterstofademtest voor de diagnostiek van vetzuurperoxidatie. *Société de Pédiatrie de Hollande*, November 1991.
58. Kneepkens CMF, **Lepage G**, Smith L, Lacaille F, Ronco N, Champagne J, Lamarre A, Osberg I, Roy CC. Low beta-carotene may contribute to the accumulation of free radicals in cystic fibrosis (CF). *Clin Invest Med* 1991;14:A41.
59. **Lepage G**, Ronco N, Champagne J, Roy CC. Essential fatty acid deficiency (EFAD) may decrease peroxisomal activity. *Federation of American Societies for Experimental Biology. FASEB J* 1992;6:A1377.
60. Kneepkens CMF, Ferreira C, **Lepage G**, Roy CC. Hydrocarbon breath test in cystic fibrosis: evidence for increased lipid peroxidation. In: *Proceedings of the 33rd Dutch Federation meeting*. Nijmegen: FMSS; 1992: 79.
61. Lohoues MJ, Russo P, Gurbindo C, Roy CC, Levy E, **Lepage G**, Seidman E. Essential fatty acid deficiency improves the course of experimental colitis in the rat: possible role of dietary immunomodulation. *Gastroenterology* 1992;102:A655.
62. Kneepkens CMF, Ferreira C, **Lepage G**, Roy CC. Hydrocarbon breath test in cystic fibrosis: evidence for increased lipid peroxidation. *Neth J Med* 1992;41:A3.
63. **Lepage G**, Ronco N, Champagne J, Roy CC. Essential fatty acid deficiency (EFAD) may decrease peroxisomal activity. *Canadian Society for Clinical Investigation. Clin Invest Med* 1992;15:A44.
64. Kneepkens CMF, Ferreira C, **Lepage G**, Roy CC. Hydrocarbon breath test in cystic fibrosis: evidence for increased lipid peroxidation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992;15:344.
65. Ferreira C, **Lepage G**, Ronco N, Champagne J, Barros FC, Roy CC. Evidence of lipid peroxidation in malnourished children with essential fatty acid deficiency (EFAD). *Canadian Society for Clinical Investigation. Clin Invest Med* 1992;15:A106.
66. Kneepkens CMF, **Lepage G**, Ferreira C, Roy CC. Lipid peroxidation in cystic fibrosis demonstrated with the hydrocarbon breath test. *Hell J Gastroenterol* 1992;5:171.

67. Levy E, Thibault L, Lacaille F, **Lepage G**, Lambert M, Roy CC. Metabolism of lipoproteins in Cystic Fibrosis patients with essential fatty acid deficiency (EFAD). Canadian Society for Clinical Investigation. Clin Invest Med 1992;15:A111.
68. **Lepage G**, Ronco N, Champagne J, Roy CC. La déficience en acides gras essentiels pourrait diminuer l'activité peroxysomiale. Club de Recherches Cliniques du Québec. Médecine Sciences 1992;8:A37.
69. Kneepkens CMF, Ferreira C, **Lepage G**, Roy CC. Vetzuurperoxidatie als oorzaak van essentiële-vertzuur-deficiëntie bij cystische fibrose [Lipid peroxidation as a cause of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis]. In: Abstract book 14th congress of the "Nederlandse Vereniging voor Kindergeneeskunde". Alkmaar: Marcelis & van der Lee/Da Costa; 1992: 224.
70. **Lepage G**, Ronco N, Champagne J, Lamarre A, Roy CC. Beta-carotene inhibits lipid peroxidation and improves peroxisomal function in Cystic Fibrosis. FASEB J 1993;7:A39.
71. Lohoues MJ, Roy CC, **Lepage G**, Russo P, Gurbindo C, Levy E, Seidman E. Effects of dietary essential fatty acid deficiency on lipid peroxidation in rat experimental colitis. American Gastroenterological Association. Gastroenterology 1993;104:A733.
72. **Lepage G**, Ronco N, Champagne J, Kneepkens CMF, Roy CC. Dysfonction peroxysomiale associée à la déficience en acides gras essentiels. Clin Invest Med 1993;16:A33.
73. **Lepage G**, Ronco N, Champagne J, Kneepkens CMF, Roy CC. Dysfonction peroxysomiale associée à la déficience en acides gras essentiels. Congrès de l'Association des Pédiatres de Langue Française, Revue Maghrébine de Pédiatrie, 1993;3:471-472.
74. **Lepage G**, Ronco N, Champagne J, Lamarre A, Roy CC. Le β -carotène corrige la lipoperoxydation et améliore la fonction peroxysomiale chez la fibrose kystique du pancréas. Médecine-Sciences 1993;9:A21.
75. Lacaille F, Paradis K, Lenaerts C, Sénéchal L, **Lepage G**, Roy CC, Rasquin-Weber A. Ursodeoxycholic acid improves essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. American Association for the study of liver diseases, 1993.
76. Lacaille F, Paradis K, Lenaerts C, Sénéchal L, **Lepage G**, Roy CC, Rasquin-Weber A. Ursodeoxycholic acid improves esential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 1993.

77. **Lepage G, Champagne J, Ronco N, Roy CC.** Exogenous hydroperoxides increase peroxisomal β -oxidation and catalase activity. *FASEB J* 1994;8:A676.
78. Herzog D, Bouthillier L, Parent P, **Lepage G, Seidman E.** Elemental diet therapy in pediatric Crohn's disease: effect on plasma fatty acids, nutritional and inflammatory parameters. North American Conference of Gastroenterology Fellows, 1995.
79. Herzog D, Bouthillier L, Parent P, **Lepage G, Roy CC, Seidman E.** Essential fatty acid sufficient elemental diet therapy in pediatric Crohn's disease: effect on nutritional and inflammatory parameters. American Gastroenterology Association, Gastroenterology 1995.
80. **Lepage G, Paradis K, Lacaille F, Sénéchal L, Ronco N, Champagne J, Roy CC, Rasquin-Weber A.** Ursodeoxycholic acid improves hepatic metabolism of essential fatty acid and retinol in cystic fibrosis children. *FASEB J* 1995;9:A441.
81. Fayon M, Lacroix J, Champagne J, **Lepage G, Chartrand C, Vobecky S, Farrell CA, Delvin E.** Plasma malondialdehyde profile in children undergoing cardiopulmonary bypass: a pilot study. *Am J Resp Crit Care Med* 1995;151:A647.
82. Lands LC, Hornby L, Xu F, Champagne J, **Lepage G.** Plasma malondialdehyde responses to short-term high intensity and progressive exercise. *Am J Resp Crit Care Med* 1995;151.
83. Yousef IM, **Lepage G, Sanchez G, Shushan B, Sakuma T.** LC/Ion Spray/MS/MS analysis of bile acids. Proceed 43rd Am Soc Mass Spectrom 1995.
84. **Lepage G, Paradis K, Lacaille F, Sénéchal L, Ronco N, Champagne J, Roy CC, Rasquin-Weber A.** Ursodeoxycholic acid improves hepatic metabolism of essential fatty acid and retinol in cystic fibrosis children. *Clin Invest Med* 1995;18.
85. **Lepage G, Yesair D, Ménard G, Ronco N, Champagne J, Lamarre A, Roy CC.** Fat in the form of an organized lipid matrix normalizes fatty acid absorption in cystic fibrosis. *Clin Invest Med* 1995;18:A42.
86. **Lepage G, Paradis K, Lacaille F, Sénéchal L, Ronco N, Champagne J, Brochu P, Roy CC, Rasquin A.** L'acide ursodésoxycholique améliore le métabolisme hépatique des acides gras essentiels et du rétinol chez la fibrose kystique du pancréas. *Médecine-Sciences* 1995;11:A21.

87. Yesair D, **Lepage G**, Roy CC, Burns M. Lym-X-Sorb: a lysophosphatidylcholine, lipid eutectic for oral delivery of fat to cystic fibrosis patients. American Oil Chemists' Society, 1996.
88. **Lepage G**, Major H, McKenna T, Preece S. The identification and characterisation of bile acids by LC/electrospray. Proceed 44rd Am Soc Mass Spectrom 1996.
89. **Lepage G**, Roy CC. Absorption des lipides: nouvelle technologie. Réunion provinciale multidisciplinaire des cliniques de fibrose kystique du pancréas, Mai 1996.
90. Yesair DW, **Lepage G**, Roy CC. Lym-X-Sorb, an ordered lipid eutectic for oral delivery of calories and polyunsaturated fatty acids. FASEB, summer research conference, Bethesda, MD, 1997.
91. **Lepage G**, Roy CC. Supplémentation orale en acides gras essentiels sous forme de LYM-X-SORB chez 73 enfants FKP: étude d'un an à double insu en cours. Réunion provinciale multidisciplinaire des cliniques de fibrose kystique du pancréas, Mai 1997.
92. Yesair DW, **Lepage G**, Roy CC. Lym-X-Sorb, an ordered lipid eutectic for oral delivery of calories and polyunsaturated fatty acids. Scandinavian forum for lipid research and technology, Ronneby, Sweden, 1997.
93. **Lepage G**, Yesair D, Ronco N, Champagne J, Bureau N, Lacombe L, Bérubé D, Roy CC. The effect of PUFA-enriched LYM-X-SORB™ on growth and lung function in patients with EFA deficiency. North American Cystic Fibrosis Conference, Ped Pulmon, September 1998.
94. Yesair D, **Lepage G**, Roy CC. Physical and biological characteristics of LYM-X-SORB™: a novel and useful lipid eutectic. North American Cystic Fibrosis Conference, Ped Pulmon, September 1998.
95. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, **Lepage G**, Bouthillier L, Si Ahmed F, Seidman E. Evidence for increased lipid peroxidation, decreased antioxidant defense and altered lipoprotein metabolism in Crohn's disease. NASPGN, 1998.