

Université de Montréal

La peroxydation lipidique altère les
propriétés de l'entérocyte et affecte l'absorption intestinale des graisses

par

Frédéric Courtois

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph. D.)

en Nutrition

janvier 2001

© Frédéric Courtois, 2001



QU

145

U58

2001

v. 008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

La peroxydation lipidique altère les
propriétés de l'entérocyte et affecte l'absorption intestinale des graisses

présentée par :

Frédéric Courtois

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Michèle Houde-Nadeau
Dr. Marielle Ledoux
Dr. Émile Levy
Dr. Edgard Delvin
Dr. Daniel Ménard

Thèse acceptée le :

SOMMAIRE

Depuis quelques dizaines d'années, le stress oxydant semble être impliqué dans de plus en plus de pathologies (athérosclérose, cancers, maladie de Parkinson, maladies auto-immunes, maladies inflammatoires). Ainsi, la morphologie et la fonction de nombreux organes peuvent en être gravement affectées. L'intestin n'est pas épargné par ce phénomène. En effet, lors de pathologies comme les maladies inflammatoires de l'intestin, on peut observer des niveaux de stress oxydant élevés. L'on ne sait toujours pas avec certitude s'il s'agit de la cause ou de la conséquence de la pathologie. Dans ce cas précis, on peut également observer en parallèle une malabsorption intestinale, notamment des lipides alimentaires, engendrant une carence en acides gras essentiels et en vitamines liposolubles.

Nous avons donc dans un premier temps cherché à comprendre s'il pouvait y avoir un lien direct entre la peroxydation lipidique et la malabsorption intestinale des graisses ; en d'autres termes si la peroxydation lipidique seule pouvait être impliquée dans les défauts d'absorption intestinale des lipides, sachant que l'on ne doit pas oublier l'implication d'autres éléments importants dans ces pathologies, comme les cytokines pro-inflammatoires. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc utilisé des cellules Caco-2 en culture sur filtre de polycarbonate (colonocytes de lignée cancéreuse se différenciant en cellules avec un phénotype entérocytaire), nos objectifs étant d'y vérifier si le système fer/ascorbate est un agent de peroxydation lipidique puissant conduisant à un transport aberrant des lipides alimentaires. La présence d'un antioxydant a permis de confirmer le rôle de la peroxydation lipidique dans les phénomènes observés. Nous avons pu observer que la capacité d'estérification des lipides, ainsi que la synthèse de certaines apolipoprotéines (B48, AIV et AI) sont diminuées au niveau cellulaire suite à l'exposition au fer/ascorbate. Par contre, un accroissement de la synthèse du cholestérol apparaît, résultant de l'augmentation de l'activité de l'enzyme HMG-CoA réductase. La présence d'hydroxytoluène butylé (BHT), se révélant comme antioxydant puissant, a permis non seulement d'inhiber la peroxydation lipidique induite par le fer/ascorbate, mais aussi de contrer les effets observés au niveau cellulaire (correction de l'estérification des lipides, de la synthèse des apolipoprotéines, de la synthèse de cholestérol et de l'activité de l'HMG-CoA réductase). La sécrétion basolatérale des lipides estérifiés et des apolipoprotéines (B100, B48, AIV) a été aussi

bien diminuée. Par contre l'exocytose du cholestérol s'est retrouvée augmentée significativement. Etant donné l'ensemble de ces altérations, on a pu constater une diminution significative de la sécrétion des lipoprotéines (chylomicrons, VLDL, LDL, HDL) dans le milieu basolatéral. La présence de BHT prévenait la diminution de la sécrétion des lipides estérifiés, des apolipoprotéines et des lipoprotéines (chylomicrons, VLDL, HDL), même si la correction de toutes ces aberrations n'atteint pas le niveau du témoin.

Toujours pour observer l'implication de la peroxydation lipidique dans les phénomènes inflammatoires intestinaux, nous avons dans un deuxième temps voulu voir si les lipopolysaccharides (endotoxine présente dans la paroi cellulaire des bactéries) et le fer/ascorbate pouvaient favoriser les facteurs pro-inflammatoires : effets sur la l'intégrité de la barrière mucoale intestinale et sur l'activité de la cyclooxygénase-2 (COX-2) qui synthétise des prostaglandines pro-inflammatoires (PGE₂). Nous avons pu ainsi remarquer que le système fer/ascorbate/ lipopolysaccharides est capable de provoquer une peroxydation lipidique, d'altérer la fluidité membranaire et la perméabilité paracellulaire, et d'augmenter l'expression et l'activité de COX-2. L'ajout d'antioxydant (butyrate-BHT) permet d'inhiber ces effets observés.

Ces résultats nous permettent donc de conclure que le stress oxydant au niveau intestinal peut diminuer l'absorption des lipides alimentaires et augmenter l'apparition de facteurs pro-inflammatoires. Ces éléments devraient donc être considérés dans l'approche thérapeutique des maladies inflammatoires. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour découvrir la totalité des mécanismes impliqués dans ces phénomènes, mais aussi pour confirmer ces observations par des études cliniques sur des patients.

TABLE DES MATIERES

<u>Liste des figures :</u>	page x
<u>Liste des tableaux :</u>	page xii
<u>Liste des abréviations :</u>	page xiv
<u>Remerciements :</u>	page xix
<u>Dédicace :</u>	page xxi
<u>Introduction :</u>	page 1
<u>1. Oxygène et espèces réactives de l'oxygène :</u>	page 3
<u>1.1.L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) :</u>	page 4
<u>1.2.Le radical hydroperoxyl ($HO_2\cdot$) :</u>	page 5
<u>1.3.L'oxygène singulet (1O_2) :</u>	page 5
<u>1.4.Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :</u>	page 5
<u>1.5.Le radical hydroxyl ($OH\cdot$) :</u>	page 6
<u>2. Dommages sur les constituants cellulaires :</u>	page 8
<u>2.1.Les dommages sur l'ADN :</u>	page 8
<u>2.2.Les dommages sur les acides aminés et les protéines :</u>	page 10
<u>2.3.Les dommages sur les lipides :</u>	page 12
<u>2.4.Indices chimiques et biochimiques du stress oxydant</u> <u>sur les molécules biologiques :</u>	page 14
<u>3. Les antioxydants :</u>	page 15
<u>3.1.Les antioxydants enzymatiques :</u>	page 15
<u>3.1.1. La réparation de l'ADN :</u>	page 15
<u>3.1.2. Les protéases :</u>	page 15
<u>3.1.3. La superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1) :</u>	page 17
<u>3.1.4. Les catalases (EC 1.11.1.6) :</u>	page 18

<u>3.1.5. La glutathion peroxydase (EC 1.11.1.9) :</u>	page 19
<u>3.2. Les antioxydants non enzymatiques :</u>	page 20
<u>3.2.1. Les antioxydants non enzymatiques liposolubles :</u>	page 20
<u>3.2.1.1. La vitamine E :</u>	page 20
<u>3.2.1.2. Les caroténoïdes :</u>	page 22
<u>3.2.1.3. Le coenzyme Q10 :</u>	page 22
<u>3.2.1.4. La bilirubine :</u>	page 23
<u>3.2.1.5. Autres molécules antioxydantes :</u>	page 23
<u>3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques hydrosolubles :</u>	page 24
<u>3.2.2.1. La vitamine C :</u>	page 24
<u>3.2.2.2. Le glutathion :</u>	page 27
<u>3.2.2.3. Les protéines liant les métaux :</u>	page 28
<u>3.2.2.4. Autres molécules antioxydantes :</u>	page 29
<u>4. Rappel sur l'absorption intestinale des lipides :</u>	page 31
<u>4.1. Digestion intraluminale des lipides :</u>	page 31
<u>4.2. Événements intracellulaires :</u>	page 33
<u>4.2.1. Passage de la membrane apicale vers le réticulum endoplasmique :</u>	page 33
<u>4.2.2. Événements observés au sein du réticulum endoplasmique :</u>	page 36
<u>4.3. Particularités des cellules Caco-2 :</u>	page 42
<u>5. Stress oxydant au niveau de l'intestin :</u>	page 44
<u>5.1. Les causes du stress oxydant au niveau de l'intestin :</u>	page 44
<u>5.2. Effets du stress oxydant sur les fonctions de l'intestin :</u>	page 53
<u>5.2.1. Effets sur la fonction de barrière sélective :</u>	page 53

<u>5.2.2. Effets sur la viabilité cellulaire des cellules intestinales :</u>	page 54
<u>5.2.3. Effets sur les propriétés physiques de la bordure en brosse des cellules épithéliales :</u>	page 55
<u>5.2.4. Effets sur les enzymes de la bordure en brosse des cellules épithéliales :</u>	page 55
<u>5.2.5. Effets sur les autres enzymes des cellules épithéliales :</u>	page 56
<u>5.2.6. Effets sur le métabolisme des cellules épithéliales :</u>	page 57
<u>5.2.7. Effets sur l'absorption des nutriments :</u>	page 62
<u>5.3. Les antioxydants des cellules épithéliales :</u>	page 64
<u>5.3.1. Les antioxydants endogènes :</u>	page 64
<u>5.3.2. Les antioxydants alimentaires :</u>	page 66
<u>Article 1 :</u> Iron-ascorbate alters efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins.	page 70
<u>Article 2 :</u> Role of iron-ascorbate and related lipid peroxidation in lipid transport by Caco-2 cells.	page 79
<u>Article 3 :</u> Synergistic effects of bacterial lipopolysaccharide- and iron/ascorbate-lipid peroxidation on Caco-2 cell integrity: possible antioxydant role of butyric acid.	page 115
<u>Discussion-Conclusion :</u>	page 150
<u>Bibliographie :</u>	page 178
<u>Annexes :</u>	page xxiii

LISTE DES FIGURES

1. Sources cellulaires d'espèces réactives (Kehrer 1993). page 3
2. Assemblage intracellulaire des lipoprotéines
(Van Greevenbroek *et al.* 1998). page 40
3. Rôle des espèces réactives dans l'inflammation (Kehrer 1993). page 46
4. Schéma récapitulatif de l'implication de la peroxydation lipidique,
induite par le fer/ascorbate, sur le métabolisme des lipides
au niveau des cellules Caco-2.. page 158
5. Schéma récapitulatif de l'implication de la peroxydation lipidique
induite par le fer/ascorbate/lipopolysaccharides dans l'activation
des processus inflammatoires intestinaux. page 165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Rôles, association aux lipoprotéines et
site d'expression des apolipoprotéines (Yamada 1991). page 38

Tableau 2 : Effets des molécules pro-oxydantes et
antioxydantes au niveau intestinal. page 47

LISTE DES ABREVIATIONS

- 13-HODE : acide 13-hydroxy octadecadiénoïque.
- $^1\text{O}_2$: oxygène singulet.
- 4-HNE : 4-hydroxynonéanal.
- $\text{A}^{2-\bullet}$: acide ascorbique.
- Aa : acides aminés.
- ACAT : acyl-coenzyme A cholestérol acyltransférase.
- ADN : acide desoxyribonucléique.
- ADP : adénosine diphosphate.
- AH : acide ascorbique réduit.
- AP-1 : Activator Protein-1.
- Apo : apolipoprotéines.
- APOBEC-1 : apolipoprotéine B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide #1.
- ARNm : acide ribonucléique messager.
- ATP : adénosine triphosphate.
- BHT : hydroxytoluène butylé.
- Cat : catalase.
- CDP : cytosine diphosphate.
- CM : chylomicron.
- CoA : coenzyme A.
- CoQH^\bullet : radical du coenzyme Q10.
- CoQH_2 : coenzyme Q10 réduite.
- COX-1 : cyclooxygénase 1.
- COX-2 : cyclooxygénase 2.
- Cys : cystéine.

- DHA : acide dehydroascorbique.
- DMSO : diméthyl sulfoxyde.
- FAD : flavine adénine dinucléotide oxydée.
- FADH₂ : flavine adénine dinucléotide réduite.
- Glu : glutamate.
- Gly : glycine.
- GSH : glutathion réduit.
- GSSG : glutathion oxydé.
- H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène.
- HDL : high density lipoprotein.
- HMG-CoA reductase : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase.
- HO₂• : radical hydroperoxyl.
- HOCl : acide hypochloreux.
- hsp 72 : heat shock protein 72.
- IDL : intermediate density lipoprotein.
- I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein.
- Il 1β : interleukine 1β.
- IP₃ : inositol triphosphate.
- KDa : kilodaltons.
- L• : radical alkyl lipidique.
- LCAT : lecithin cholesterol acyltransferase.
- LDL : low density lipoprotein.
- L-FABP : liver fatty acid-binding protein.
- LH : acide gras polyinsaturé.

- LOH : alcool d'acide gras polyinsaturé.
- LOO• : radical peroxy lipidique.
- LOOH : peroxyde lipidique.
- LPL : lipoprotéine lipase.
- MCP : multicatalytique protéase.
- MDA : malondialdéhyde.
- Mⁿ⁺ : ion métal.
- MOP : macroxyprotéinase.
- MTP : microsomal triglyceride transfer protein.
- MVM-FABP : microvillus membrane fatty acid-binding protein.
- N₂O₃ : trioxyde de diazote.
- N₂O₄ : tetroxyde de diazote.
- NAD⁺ : nicotinamide-adénine dinucléotide oxydé.
- NADH : nicotinamide-adénine dinucléotide réduit.
- NADP⁺ : nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate oxydé.
- NADPH : nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate réduit.
- NO : oxyde nitrique.
- NO₂• : dioxyde d'azote.
- O₂^{-•} : anion superoxyde.
- O₂²⁻ : ion peroxyde.
- O₃ : ozone.
- OH• : radical hydroxyl.
- ONOO⁻ : peroxydinitrite.
- ONOO⁻ : peroxydinitrite.

- ONOOH : acide peroxy-nitrique.
- PDGF : platelet derived growth factor.
- PDI : protein disulfide isomerase.
- PGF : prostaglandine F.
- P-LOH : phospholipide avec un alcool d'acide gras polyinsaturé.
- P-LOOH : phospholipide avec un peroxyde lipidique.
- PMN : neutrophiles polymorphonucléaires.
- R• : radical alkyl.
- RO• : radical alkoxy.
- ROH : alcool organique.
- ROO• : radical peroxy.
- ROOH : peroxyde organique.
- SCP₂ : sterol carrier protein-2.
- SOD : superoxyde dismutase.
- TCM : triglycérides à chaîne moyenne.
- TGFβ1 : transforming growth factor β1.
- TNFα : tumor necrosis factor alpha.
- VLDL : very low density lipoprotein.
- α-T• : radical tocopheryl.
- α-TH : alpha-tocophérol réduit.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement :

Monsieur le Docteur **Emile Levy**, ainsi que toutes les personnes du laboratoire de Gastroentérologie et de Nutrition du Centre de Recherche de l'Hôpital Sainte Justine,

Madame le Docteur **Marielle Ledoux**,

Madame le Docteur **Christine Des Rosiers**,

Messieurs les Docteurs **Michel Dauça** et **Philippe Becuwe**,

Madame le Docteur **Geneviève Renier**, ainsi que toutes les personnes du Centre de Recherche de l'Hôpital Notre Dame,

Madame **Raymonde Le Breton**, ainsi que toutes les personnes du département de Nutrition,

pour leur aide très précieuse dans la réalisation de mon Doctorat.

Je tiens à remercier également, tout particulièrement,

Madame **Audrey Courtois-Lemoine**,

pour son courage, pour son aide, pour sa gentillesse, ... en bref, pour tout.

DEDICACE

A mon Grand-père, qui restera toujours dans ma mémoire.

A ma Grand-mère, pour son courage.

A leur merveilleux Amour par delà la mort.

A ma Famille.

A mon Epouse.

INTRODUCTION

Le terme "stress oxydant" est apparu au cours de ces quinze à vingt dernières années. Sies (1991) l'a défini comme "un désordre dans l'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants en faveur des pro-oxydants, ce qui peut causer des dommages potentiels". Le terme "radical" quant à lui désigne toute molécule qui contient au moins un électron non apparié, contrairement au terme "espèce réactive" qui regroupe à la fois les radicaux libres et les espèces réactives non radicalaires, telles que le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux, et les hydroperoxydes (Kehrer 1993).

Les cellules produisent de manière physiologique des espèces réactives, et ce de manière continue. Ainsi, on peut observer la formation d'espèces réactives (figure 1) (Kehrer 1993) au niveau des membranes plasmiques (par la NADPH-oxydase, les lipoxgénases, les cyclooxygénases), du cytosol (par les oxydases solubles), des mitochondries (par le système de transport des électrons), des lysosomes (par la myeloperoxydase), des peroxysomes (par les oxydases et les flavoprotéines), et du réticulum endoplasmique (par les oxydases et les cytochromes).

L'homéostasie au sein de la cellule est conservée par l'intervention d'antioxydants exogènes ou endogènes pour contrer les effets néfastes des espèces réactives produites de manière continue et physiologique dans l'organisme. Cependant, si cette production est augmentée, si des molécules exogènes pro-oxydantes viennent s'ajouter ou si la production ou l'apport exogène d'antioxydants est diminué, l'équilibre entre pro-oxydants et antioxydants est rompu au profit de ces premiers.

L'ensemble des constituants cellulaires (ADN, protéines, saccharides, et lipides) se retrouvent souvent affectés, ce qui peut avoir des répercussions à plus ou moins long terme sur l'organisme tout entier. En effet, il existe une grande variété de pathologies où le stress oxydant est impliqué, qu'il soit la cause ou la conséquence de la maladie. Il s'agit entre autres de l'athérosclérose, l'arthrite, la cataracte de l'œil, les cancers, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, et les maladies auto-immunes (Gille *et al.* 1995, Halliwell *et al.* 1986b, Kehrer 1993).

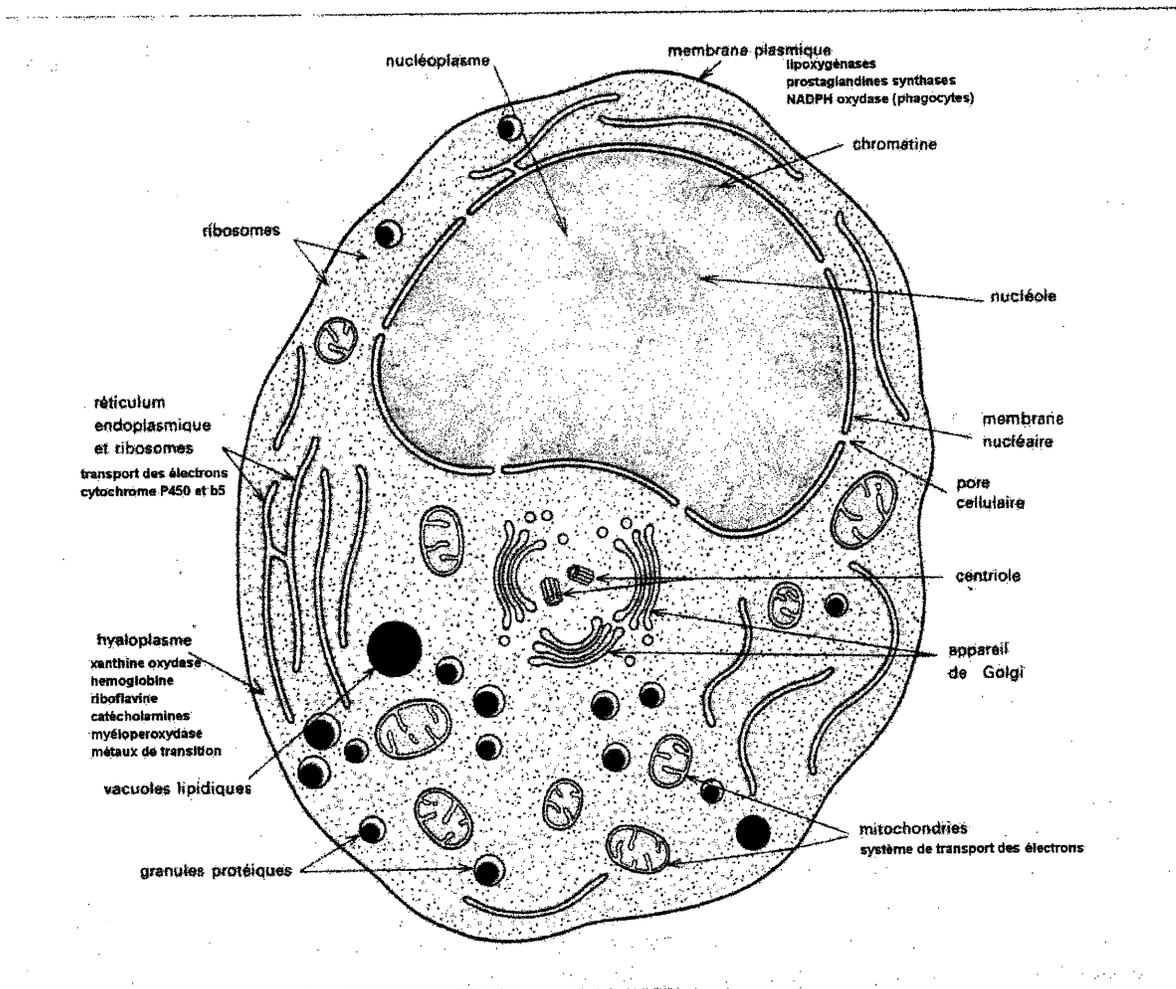


Figure 1 : Sources cellulaires d'espèces réactives (Kehrer 1993).

1. Oxygène et espèces réactives de l'oxygène :

L'oxygène joue un rôle vital de l'organisme en tant qu'accepteur terminal d'électrons pendant la respiration cellulaire. Bien que la molécule d'oxygène ait deux électrons non appariés sur ses orbitales moléculaires, elle n'est pas réactive (Halliwell *et al.* 1990). Cela est dû au fait que ces deux électrons, avec des spins parallèles, sont sur des

orbitales antiliantes π différentes. Cela limite donc sa réactivité car l'acquisition d'une paire d'électrons d'autres atomes ou molécules nécessite que les deux électrons de l'oxygène aient le même numéro de spin antiparallèle (ou complémentaire) et qu'ils peuvent se placer dans l'espace libre de l'orbital π (Gille *et al.* 1995).

Cependant, la réduction univalente de l'oxygène produit le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), la réduction bivalente génère le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et enfin la réduction trivalente produit le radical hydroxyl ($OH\cdot$). Ces métabolites de l'oxygène deviennent toxiques pour la cellule, car ils peuvent réagir avec de nombreux composants cellulaires et modifier ainsi leur structure. Ce sont des espèces réactives de l'oxygène.

1.1. L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) :

La production de l'anion superoxyde peut se faire de différentes manières : par autooxydation avec les hydroquinones, les flavines, l'hémoglobine, le glutathion et autres thiols, les catécholamines, et les ions métaux de transition par des enzymes ou complexes enzymatiques (l'oxydation dépendante des flavines, la chaîne respiratoire mitochondriale, l'oxygénation microsomale, la réduction de l'oxygène NADPH-dépendante par les granulocytes et les macrophages : $NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^{\cdot-}$). Les xénobiotiques (antimycine, adriamycine, paraquat) et les facteurs physiques (lumière ultraviolette, ultrasons, rayons x et γ) (Gille *et al.* 1995, Jore *et al.* 1989, Stadtman 1993) peuvent également engendrer des anions superoxydes.

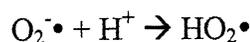
Il s'agit en fait de l'acquisition d'un électron : $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-}$

L'anion superoxyde est généré délibérément par les macrophages activés ou les autres cellules du système immunitaire comme une arme cytotoxique, mais aussi afin de générer un processus chimiotactique conduisant les phagocytes sur le lieu de l'inflammation (Gille *et al.* 1995, Jore *et al.* 1989). L'anion superoxyde est hautement réactif et stable dans un environnement hydrophobe ; il perd sa réactivité et sa stabilité dans un milieu hydrophile (Halliwell *et al.* 1986b). Enfin, l'anion superoxyde peut réagir

avec l'oxyde nitrique (NO) pour former une espèce très réactive, le peroxynitrite (ONOO⁻) (Saran *et al.* 1990).

1.2. Le radical hydroperoxyl (HO₂•) :

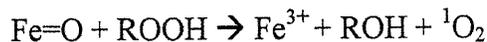
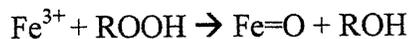
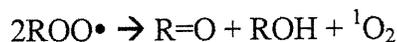
Le radical hydroperoxyl provient de la réaction de l'anion superoxyde avec un proton (Gille *et al.* 1995, Jore *et al.* 1989) :



Il s'agit donc de l'acide conjugué de l'anion superoxyde. Il réagit plus rapidement et de manière plus importante que l'anion superoxyde avec les acides gras polyinsaturés, car le radical hydroperoxyl est plus soluble dans les membranes (hydrophobe) (Jore *et al.* 1989).

1.3. L'oxygène singulet (¹O₂) :

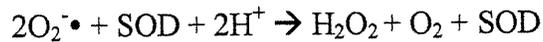
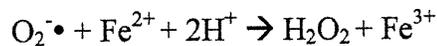
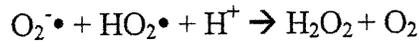
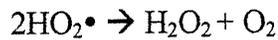
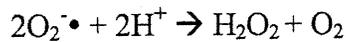
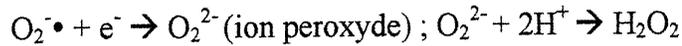
L'oxygène singulet peut provenir de l'activation de l'oxygène par transfert de charge (Type I) ou par transfert d'énergie (Type II), mais également par un radical peroxy (ROO•) ou par le fer (Fe=O) (Gille *et al.* 1995, Sies 1986), selon les réactions suivantes :



1.4. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

Tout système produisant l'anion superoxyde produit également du peroxyde d'hydrogène. Ce dernier peut provenir de la réduction bivalente de l'oxygène, mais aussi

de la réaction entre deux anions superoxyde, de deux radicaux hydroperoxyls, d'un anion superoxyde et d'un radical hydroperoxyl, d'un anion superoxyde et d'un ion Fe^{2+} , ou d'une superoxyde dismutase (SOD) et de deux anions superoxyde (Gille *et al.* 1995, Jore *et al.* 1989) selon les réactions suivantes :

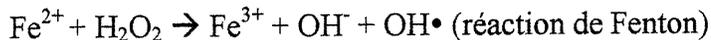


La déamination des acides aminés (Aa) par les acides aminés oxydases (EC 1.4.3.2, 1.4.3.3) des peroxyosomes et l'oxydation du glucose en δ -gluconolactone par la glucose oxydase (EC 1.1.3.4) engendrent également du peroxyde d'hydrogène (Gille *et al.* 1995). La production de peroxyde d'hydrogène dans le foie est de 90 $\mu\text{mol}/\text{min}$ à 22°C (Boveries *et al.* 1972).

Contrairement à l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène peut facilement traverser les membranes biologiques (Halliwell *et al.* 1986b, 1990), et peut ainsi causer des dommages par l'intervention de réactions radicalaires même dans des endroits éloignés de son lieu d'origine (Saran *et al.* 1991). De plus, certaines molécules, comme l'histidine, peuvent transporter le peroxyde d'hydrogène et augmenter ainsi sa distance de diffusion (Gille *et al.* 1995).

1.5. Le radical hydroxyl (OH^{\cdot}) :

L'anion superoxyde ne peut attaquer que peu de molécules ; le peroxyde d'hydrogène possède lui aussi une faible réactivité. Mais ils peuvent être précurseurs du radical hydroxyl par une réaction métal-dépendante : la réaction d'Haber-Weiss (Halliwell *et al.* 1986b, 1991) :

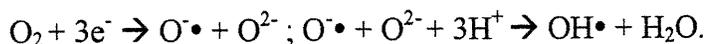


Le métal intervenant peut également être le titane, le cuivre, le nickel ou le cobalt.

Le fer sous forme ferrique (Fe^{3+}) réagit plus lentement avec le peroxyde d'hydrogène que le fer ferreux (Fe^{2+}) (Halliwell *et al.* 1991). Ainsi, des agents réducteurs comme l'ascorbate stimulent la réaction de Fenton (le mélange fer et ascorbate est d'ailleurs souvent utilisé dans des études *in vitro* pour générer le radical hydroxyl).

Le fer n'existe pas sous forme libre dans les systèmes biologiques. En effet, il est lié à des protéines, aux membranes, aux acides nucléiques, ou aux agents chélateurs de faible poids moléculaire (Halliwell *et al.* 1986b). Le fer qui n'est pas directement utilisé par la cellule est séquestré dans la ferritine ou lié à la transferrine. Certains agents réducteurs comme l'acide ascorbique (Crichton *et al.* 1987) ou l'anion superoxyde (Buettner *et al.* 1987, Halliwell *et al.* 1986b) peuvent libérer le fer de ces protéines, ainsi qu'une chute du pH intracellulaire en dessous de pH 6 (Bast *et al.* 1991) comme c'est le cas lors du processus inflammatoire.

Le radical hydroxyl peut également provenir de l'ajout de 3 électrons à l'oxygène (Gille *et al.* 1995) :



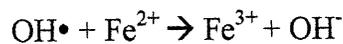
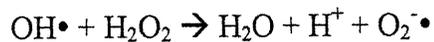
Enfin, il a été démontré que le radical hydroxyl pouvait provenir de la décomposition du peroxydinitrite (Beckman *et al.* 1990).

Le radical hydroxyl est l'une des espèces les plus réactives. Il réagit avec toute sorte de molécules cellulaires : les sucres, les acides aminés, les phospholipides, les nucléotides, et les acides organiques. Il a un potentiel redox de 2 volts (Elstner 1991).

Les réactions prooxydantes causées par le radical hydroxyl peuvent engendrer l'élimination d'un atome d'hydrogène, l'addition d'une double liaison ou d'un noyau aromatique, ou le transfert d'électron (Halliwell *et al.* 1991).

Contrairement à l'anion superoxyde et au peroxyde d'hydrogène, il n'existe pas de mécanisme enzymatique de protection contre le radical hydroxyl (Halliwell *et al.* 1991). En effet, ce dernier est si réactif qu'il réagit sur ou proche de son site de formation. D'où la notion de "site spécifique" ; c'est à dire que les dommages sont réalisés sur les lieux de localisation des métaux catalytiques. Si les métaux sont attachés à l'ADN ou aux membranes plasmiques ou celles des organelles, la cellule peut subir de graves dommages. Si les métaux sont liés à une protéine enzymatique, celle-ci peut être inactivée, et particulièrement si le fer se lie sur son site catalytique (Halliwell *et al.* 1986b).

Certaines réactions permettent la disparition du radical hydroxyl (Gille *et al.* 1995) :



2. Dommages sur les constituants cellulaires :

Les espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres peuvent directement provoquer des dommages aux constituants cellulaires (ADN, lipides, protéines, hydrates de carbone), engendrant ainsi des radicaux peroxy, qui peuvent à leur tour amplifier les dommages sur d'autres molécules cellulaires.

2.1. Les dommages sur l'ADN :

Les radicaux libres, comme les peroxydes, l'anion superoxyde ou le radical hydroxyl, sont responsables de la modification de 10^4 à 10^5 bases par cellule et par jour dans l'ADN (Poulsen *et al.* 1998, Stadtman 1993). On peut observer généralement des cassures simple-brin ou double-brin, des échanges entre deux chromatides sœurs, des modifications des bases, des liaisons ADN-ADN et protéines-ADN, et enfin des dimères de pyrimidines (Pacifci *et al.* 1991). Les quatre bases peuvent être modifiées par

l'oxydation, mais la cytosine et surtout la thymidine sont les plus sensibles (Pacifci *et al.* 1991). L'oxygène singulet quant à lui est peu réactif vis-à-vis des bases, sauf en ce qui concerne la guanine (Morliere *et al.* 1992).

Les produits de peroxydation lipidique, comme l'hydroperoxyde de l'acide linoléique, peuvent provoquer des cassures double brin dans l'ADN ; cela démontre donc que la peroxydation lipidique peut avoir des répercussions graves sur la cellule dans son ensemble et que le noyau n'est pas épargné (Stadtman 1993).

Le sucre ou le phosphate peuvent également être atteints, provoquant ainsi des cassures de brins d'ADN. Il peut en outre apparaître des terminaisons non-3'-OH et non-5'-PO₄ qui ne peuvent fixer la ADN-polymérase ; elles doivent être éliminées par des nucléases avant que la réparation puisse avoir lieu (Pacifci *et al.* 1991).

Suite à ces cassures dans l'ADN, on peut noter une augmentation de la liaison de la poly(ADP-ribose) polymérase sur l'ADN qui participe à la réparation de l'ADN. Seulement, cette enzyme nécessite du NAD⁺ pour synthétiser du poly(ADP-ribose) (Berger 1991, Kirkland 1991). Ainsi, si une quantité importante d'enzyme est nécessaire, les niveaux de NAD⁺, puis par la suite, ceux d'ATP vont diminuer, pouvant mener la cellule à la mort (Berger 1991, Kirkland 1991).

Il a également été observé que les espèces réactives de l'oxygène pouvaient induire des changements permanents dans la séquence d'ADN qui peuvent ainsi activer des proto-oncogènes ou inactiver des gènes suppresseurs de tumeur (Cerutti 1991). Les proto-oncogènes, comme c-fos, c-jun et c-myc, sont connus pour stimuler l'activité de la protéine kinase C ainsi que sa translocation dans la membrane plasmique (Cerutti 1991). L'expression de ces gènes est généralement liée à la libération de calcium intracellulaire, à un effet direct des espèces réactives de l'oxygène sur le gène, à des effets sur le cytosquelette et la matrice nucléaire, au changement de l'équilibre redox de la cellule (Gille *et al.* 1995).

2.2. Les dommages sur les acides aminés et les protéines :

Les acides aminés peuvent être la cible du stress oxydant. En effet, ils peuvent subir l'attaque d'un radical libre, comme le radical hydroxyl (qui est capable d'attaquer tous les acides aminés), provoquant ainsi la modification de leur structure (annexe 1) (Stadtman 1993).

Certains acides aminés peuvent jouer un rôle précis quand ils sont atteints par les radicaux libres : c'est le cas de l'histidine qui, lorsqu'elle est oxydée, sert de site de reconnaissance pour les protéases qui vont dégrader ainsi la protéine défectueuse (Sies 1986).

Les protéines peuvent également être la cible du stress oxydant. Cela a été démontré dans de nombreuses conditions comme le vieillissement, la cataracte, l'athérosclérose, le diabète et les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson) (Dean *et al.* 1997). L'oxydation des protéines peut être provoquée par l'attaque d'un électron célibataire, par des réactions dépendantes des ions métaux ou par autoxydation des lipides ou des sucres (Dean *et al.* 1997).

Deux patrons distincts sont apparents dans l'oxydation des protéines. Il peut y avoir une atteinte de la protéine, au niveau du groupement lié au carbone α d'un des acides aminés (annexe 2). Ainsi apparaîtra un radical peroxy sur la chaîne aliphatique en présence d'oxygène, mais aussi par la suite un radical alkoxy. Il peut y avoir aussi une atteinte du carbone α d'un des acides aminés (annexe 3). Un radical peroxy pourra également apparaître en présence d'oxygène, mais cette fois-ci sur le carbone α . Les atteintes peuvent dans ce cas être plus graves, car il peut y avoir un β -scission ou tout simplement une hydrolyse de la liaison peptidique.

L'oxydation de la protéine peut faire intervenir des ions métaux qui agissent au niveau des acides aminés auxquels ils se lient (Stadtman 1993). Il s'agit des résidus histidine, proline, arginine, et lysine. C'est ainsi que certaines enzymes peuvent être inactivées par les ions métaux. C'est le cas de la glutamine synthetase (Levine *et al.* 1981, Nakamura *et al.* 1984), de la peroxydase gastrique (Das *et al.* 1998), de la

phosphatase alcaline (Coleman 1992, Dudeja *et al.* 1993), de la glucose-6-phosphate dehydrogénase (Ogino *et al.* 1995), de l'hexokinase (Canesi *et al.* 1998), de la glyceraldéhyde-3-phosphate dehydrogénase, de l'aspartate aminotransférase et de la phosphoglycérate kinase (Oliver *et al.* 1987).

L'oxygène singulet peut également être à l'origine de l'atteinte des protéines (Dean *et al.* 1997), et notamment dans l'inactivation de la catalase (Gantchev *et al.* 1995).

Suite à ces modifications oxydatives des protéines, des bases de Schiff apparaissent. Une des caractéristiques de ces dernières est d'avoir une durée de "vie" très courte. Ces bases sont formées à partir de la réaction des groupements carbonyles avec les amines ; par exemple durant l'exposition des protéines avec des aldéhydes dérivés des lipides, avec des sucres autoxydants, ou avec des aldéhydes dérivés des acides aminés (Dean *et al.* 1997).

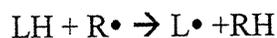
Les protéines mitochondriales de transport des électrons peuvent être la cible du stress oxydant, ainsi que celles présentes dans les microsomes, comme la famille des cytochromes P-450, et dans ce dernier cas, cela peut être indépendant de l'oxydation des lipides (Dean *et al.* 1997, Masuda *et al.* 1979). Même si l'oxydation des protéines peut être dépendante de l'oxydation des lipides, il existe des cas où ces deux phénomènes sont indépendants l'un de l'autre, par exemple dans le milieu extracellulaire du tissu conjonctif, pouvant engendrer des problèmes au niveau des cartilages (Dean *et al.* 1984 et 1997,).

Les mécanismes de contrôle de l'oxydation des protéines ont jusqu'à présent été peu étudiés ; aucune tentative importante n'a encore été menée pour élucider de manière distincte les particularités de l'antioxydation des protéines et celles des lipides, comme par exemple l'importance différente entre les radicaux peroxy et alkoxy dans les deux processus (Dean *et al.* 1997).

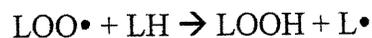
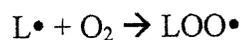
2.3. Les dommages sur les lipides :

L'oxydation peut toucher les acides gras polyinsaturés. Plusieurs étapes sont mises en jeu dans ce processus d'oxydation (Halliwell *et al.* 1986a, Jore *et al.* 1989, Krinsky 1992) :

Initiation : il s'agit de l'étape où un acide gras polyinsaturé (LH) entre en contact avec une espèce radicalaire (R•) comme le radical hydroxyl (OH•), le radical peroxy (ROO•), le radical alkoxy (RO•), ou le radical alkyl (R•), pour former un radical alkyl lipidique (L•) :



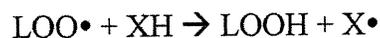
Propagation : après intervention d'oxygène, le radical alkyl lipidique (L•) forme un radical peroxy lipidique (LOO•), qui pourra à son tour attaquer un autre acide gras polyinsaturé (LH) et former ainsi un peroxyde lipidique (LOOH) :



Ce cycle se renouvelle théoriquement à l'infini.

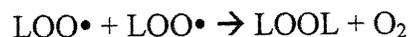
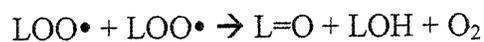
Le peroxyde lipidique (LOOH) sera ensuite dégradé en composés comme le aldéhyde (malondialdéhyde et 4-hydroxynonénal).

Interruption : tout composé (XH) qui réagit avec les radicaux peroxy (LOO•) lipidiques pour former des substances non réactives permet l'interruption de la propagation :



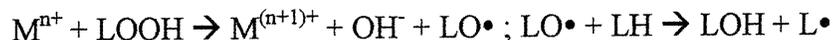
Ce composé XH peut être par exemple l' α -tocophérol.

Il est intéressant de noter que deux radicaux peuvent interagir entre eux et interrompre la propagation :





Réinitiation : l'intervention d'ions métaux (M^{n+}), comme le cuivre ou le fer, peut relancer la peroxydation lipidique à partir des produits de l'interruption :



Si l'on prend le cas du fer :



Le cholestérol peut également être la cible du stress oxydant, engendrant ainsi du 5,6-époxyde et du 5- α -hydroperoxyde cholestérol qui sont connus pour être des agents mutagènes (Sies 1986).

Les effets de la peroxydation lipidique sont aussi variés qu'étendus. En effet, l'oxydation des lipides est impliquée dans le développement des lésions athérosclérotiques, et dans l'inactivation de certaines enzymes. Elle intervient aussi dans l'altération des membranes cellulaires, ce qui se traduit entre autre par une diminution de la fluidité membranaire, par des modifications des flux ioniques et des transports transmembranaires, par une modification des potentiels transmembranaires, une inactivation des récepteurs membranaires, et une dérégulation des systèmes messagers. Enfin, elle est impliquée dans le gonflement et la destruction des mitochondries, dans l'hémolyse des erythrocytes (anémie hémolytique), et dans l'accélération du processus de vieillissement (Jore *et al.* 1989).

Un des effets bien connus de la peroxydation lipidique est la formation de pontages entre les lipides et les protéines, au niveau des acides aminés soufrés (Jore *et al.* 1989) ; de même, les dialdéhydes (produits hydrosolubles de la dégradation des peroxydes lipidiques), comme le malondialdéhyde, peuvent jouer un rôle dans l'agrégation des protéines, formant ainsi les pigments de lipofuscine que l'on peut observer lors du processus de vieillissement (Pacifci *et al.* 1991). Est également bien accepté le fait que

les produits de la peroxydation lipidique peuvent agir sur les groupements NH_2 de l'ADN, ce qui peut provoquer des mutations et des altérations géniques (Pacifici *et al.* 1991).

Il est important de savoir que la peroxydation lipidique n'est pas seulement un événement dommageable. En effet, la phospholipase A_2 hydrolyse préférentiellement les phospholipides oxydés, car ils sont plus hydrophiles et donc plus facilement atteints par l'enzyme (Sies 1986). L'acide gras ainsi libéré (essentiellement l'acide arachidonique) peut ainsi être mis à la disposition des lipoxygénases et cyclooxygénases pour former des composés actifs, comme les eicosanoïdes (leucotriènes et prostaglandines), qui sont des médiateurs cellulaires importants (Jore *et al.* 1989, Pacifici *et al.* 1991, Sies 1986).

2.4. Indices chimiques et biochimiques du stress oxydant sur les molécules biologiques :

Dans le but de démontrer que le stress oxydant touche bien des molécules biologiques précises, des tests ont été mis au point pour doser la peroxydation lipidique tel que le dosage du malondialdéhyde et du 4-hydroxynonéal (Jore *et al.* 1989, Kehrer 1993). Récemment, les F_2 -isoprostanes, comme le 8-epiPGF₂, ont été reconnus comme des marqueurs très spécifiques de la peroxydation lipidique (de Zwart *et al.* 1999). L'oxydation des protéines peut également être évaluée, notamment par la mesure des groupements carbonyles (Berlett *et al.* 1997, Kehrer 1993). L'inconvénient du dosage des groupements carbonyles est qu'il surestime l'oxydation des protéines dans les systèmes biologiques complexes, et ce dosage ne devrait être réservé qu'aux protéines purifiées (Dean *et al.* 1997). Maintenant, par l'utilisation de techniques comme la spectrométrie de masse, il est possible de mesurer des acides aminés biomarqueurs spécifiques de l'oxydation des protéines (*o*- et *m*-tyrosine, *o,o'*-dityrosine et 3-chloro- et 3-nitro-tyrosine) (Dean *et al.* 1997). D'autres analyses permettent aussi de mettre en évidence un stress oxydant au niveau cellulaire, telles que la mesure du glutathion réduit et oxydé, des protéines thiols réduites et oxydées, des activités de certaines enzymes (comme la calcium ATPase et la superoxyde dismutase, du contenu en antioxydants (exemple

vitamines A et E), de l'oxydation de la myoglobine, des nucléosides oxydés (exemple la 8-hydroxydeoxyguanosine) (Carr *et al.* 1999, Kehrer 1993).

3. Les antioxydants :

Un composant est considéré comme antioxydant quand il est capable de protéger les systèmes biologiques contre les effets nuisibles des réactions que peuvent causer les oxydations excessives (Krinski 1992). Le but de ces composés est de prévenir, d'intercepter, de réparer et d'éliminer les dommages provoqués par les pro-oxydants.

Il est classique de distinguer deux types d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

3.1. Les antioxydants enzymatiques :

3.1.1. La réparation de l'ADN :

Il a été montré que certaines endo- et exo-nucléases clivent préférentiellement l'ADN oxydé ; les nucléases permettent la réparation de ce dernier par excision des nucléotides et des bases, réparation par recombinaison, "mismatch repair" (c'est à dire localisation du mauvais appariement et correction) et réparation "error-prone" (système SOS) (Sies 1986). Il a été proposé d'utiliser le terme de redoxyendonucléase pour toute nucléase qui participe à la réparation de l'ADN endommagé par oxydation (Pacifci *et al.* 1991).

Chez les eucaryotes, plusieurs glycosylases agissant sur les produits de l'ADN oxydé ont été identifiées (Pacifci *et al.* 1991) ; elles initient la réparation en hydrolysant la liaison base-sucre des bases modifiées ou incorrectes. Cela génère des sites sans bases ou sites AP (Demple *et al.* 1994).

Les altérations oxydatives des acides nucléiques perturbent la transcription, la traduction, et la réplication de l'ADN (Pacifici *et al.* 1991). Cela peut entraîner des mutations et à long terme la mort cellulaire. Le code génétique, quant à lui, est aussi la cible du stress oxydant ; en effet, il a été démontré qu'une base sur 13000 est modifiée dans l'ADN nucléaire, et qu'une base sur 8000 est modifiée dans l'ADN mitochondrial, et ce dans des conditions physiologiques.

3.1.2. Les protéases :

L'exposition des cellules à un stress oxydant provoque une activation des enzymes protéolytiques et un accroissement de la susceptibilité des protéines modifiées par oxydations à la protéolyse (Pacifici *et al.* 1991). En effet, la modification d'une protéine par une ou des espèces réactives est suffisante pour générer la réponse protéolytique. L'augmentation de l'activité protéolytique est liée à l'hydrophobicité et à la dénaturation de la protéine. Il a donc été proposé que l'hydrophobicité de la protéine marque celle-ci comme étant dénaturée, donc nécessitant une protéolyse (Pacifici *et al.* 1991).

Cependant, quand l'oxydation des protéines est très violente, ces dernières sont moins susceptibles de subir l'action des enzymes protéolytiques, car les changements chimiques et structuraux sont tels qu'elles en deviennent beaucoup moins faciles à être dégradées (Dean *et al.* 1997).

Les sites protéolytiques potentiels des protéines oxydées sont les mitochondries, les lysosomes et les protéasomes (Dean *et al.* 1997).

La macroxyprotéinase (MOP), complexe protéolytique de 670 kDa, possède trois sites d'activités protéolytiques. L'enzyme est indépendante de l'ATP, avec un pH optimum alcalin (pH 7,8). Il existe d'autres complexes protéolytiques de haut poids moléculaire qui sont identiques à la MOP. Ce sont l'ingensine, la macropaine, la macrosine, le protéasome et la multicatalytique protéase (MCP) (Pacifici *et al.* 1991). La MOP est responsable de la dégradation des protéines aberrantes, prévenant ainsi leur

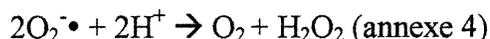
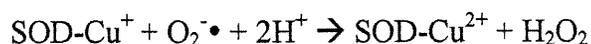
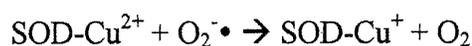
accumulation ou leur agrégation, et fournissant ainsi les acides aminés nécessaires à la synthèse *de novo* des protéines (Pacifici *et al.* 1991).

3.1.3. La superoxyde dismutase (EC 1.15.1.1) :

Il existe deux types de superoxyde dismutase (SOD) classées en deux familles : la SOD cuivre-zinc (CuZnSOD) et la SOD contenant du manganèse (MnSOD) (Fridovich 1989).

La CuZnSOD apparaît dans le cytoplasme et la matrice des lysosomes (Halliwell *et al.* 1991). Elle a une masse molaire de 32 kDa et est composée de deux sous unités ; chacune des sous unités contient un ion cuivre et un ion zinc (Halliwell *et al.* 1991). La majorité de la surface de ces sous unités est chargée négativement ; cependant la chaîne active est chargée positivement afin de diriger électrostatiquement l'anion superoxyde vers le centre actif (Gille *et al.* 1995).

La CuZnSOD permet la disparition de 2 molécules d'anions superoxyde :



Le zinc a une fonction stabilisante, alors que le cuivre joue un rôle plus réactionnel dans la disparition des anions superoxyde (Gille *et al.* 1995).

Il est intéressant de noter que le produit de la réaction, le peroxyde d'hydrogène, inactive de manière irréversible l'enzyme (Gille *et al.* 1995, Pacifici *et al.* 1991). Elle devient ainsi un excellent substrat pour la MOP (Pacifici *et al.* 1991).

Pour conserver l'homéostasie de la cellule, il doit exister un équilibre entre la catalase (et autres peroxydases) et la SOD. Dans le cas contraire, il y a accumulation de peroxyde d'hydrogène, puis formation de radicaux hydroxyls catalysés par la SOD (Gille

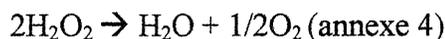
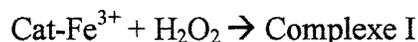
et al. 1995). Ce mécanisme pourrait expliquer en partie les dommages subit par la cellule suite à une augmentation de l'activité de la SOD.

La MnSOD se trouve dans la matrice des mitochondries (Halliwell *et al.* 1991). Elle a une masse molaire de 40 kDa et comprend 4 sous-unités avec 1 ion manganèse par sous-unité ou pour 2 sous-unités (Gille *et al.* 1995). Pendant la réaction catalytique, l'ion manganèse passe par une variété d'états d'oxydoréduction, mais le mécanisme exact de catalyse n'est pas encore clarifié (Gille *et al.* 1995). Contrairement à la CuZnSOD, la MnSOD n'est pas inactivée par le peroxyde d'hydrogène (Yim *et al.* 1990).

3.1.4. Les catalases (EC 1.11.1.6) :

Il s'agit d'hémoprotéines (elles contiennent une protohème-IX) ; il s'agit de tétramères de masse molaire entre 225 et 270 kDa. Leur activité est optimale entre pH 5 et 10 (Gille *et al.* 1995). Peu d'activité de la catalase se retrouve dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique ; elle est fortement accumulée dans les peroxysomes, où ces enzymes éliminent le peroxyde d'hydrogène provenant de la β -oxydation des acides gras (Gille *et al.* 1995).

Les catalases permettent la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau :



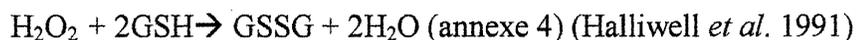
L'anion superoxyde est capable d'inhiber la catalase, en convertissant l'enzyme en complexe III inactif :

$\text{Cat-Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Cat-Fe}^{2+}\text{-O}_2$ (complexe III) (Gille *et al.* 1995, Halliwell *et al.* 1986b).

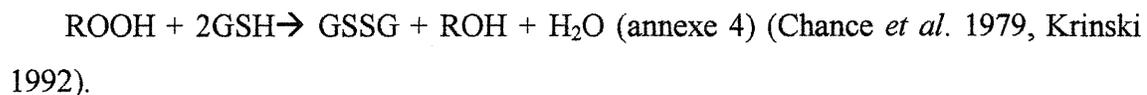
L'acetaldehyde est, quant à lui, capable d'inhiber la catalase, en entrant en compétition avec le peroxyde d'hydrogène.

3.1.5. La glutathion peroxydase (EC 1.11.1.9) :

Il s'agit d'une enzyme à sélénium. Elle est essentiellement cytosolique ; elle est inactivée par l'anion superoxyde, mais surtout par le radical hydroxyl (Krinski 1992). Elle catalyse l'oxydation du glutathion réduit (GSH, tripeptide Glu-Cys-Gly avec un groupement -SH sur la Cys) en glutathion oxydé (GSSG) avec consommation de peroxyde d'hydrogène :



Cette réaction peut également avoir lieu avec des hydroperoxydes organiques et lipidiques (ROOH) :

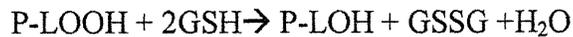


La réduction du GSSG en GSH est catalysée par la glutathion reductase (EC 1.6.4.2) en présence de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Gille *et al.* 1995). La consommation croissante de GSH et de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ avec une augmentation de l'activité de la glutathion peroxydase affaiblira la cellule (Farber *et al.* 1990), car l'accumulation de GSSG est associée à la libération de calcium dans le cytosol (Bellomo *et al.* 1982), ce qui peut engendrer des dommages cellulaires sévères, mais aussi perturber le métabolisme cellulaire. Cependant, il existe une voie d'élimination du GSSG par des transporteurs qui nécessite la glutathion-S-transferase (Sies 1986).

L'intestin présente une particularité importante, car les membranes basolatérales des cellules de l'épithélium intestinal possèdent un système Na^+ -GSH dépendant qui permet la captation et l'utilisation du GSH exogène (Sies 1986).

Il semble exister une "collaboration" entre la catalase et la glutathion peroxydase, par la répartition géographique stratégique dans la cellule (2/3 de l'activité glutathion peroxydase est localisée dans le cytosol, le tiers restant dans les mitochondries ; la catalase quant à elle dans les peroxysomes) (Flohé *et al.* 1971).

Il existe une glutathion peroxydase d'hydroperoxydes de phospholipides qui agit directement sur les hydroperoxydes de phospholipides (P-LOOH) sans avoir besoin d'hydrolyser ces derniers pour libérer l'hydroperoxyde d'acides gras (LOOH) (Krinski 1992) :



3.2. Les antioxydants non enzymatiques :

Les antioxydants non enzymatiques peuvent être divisés en deux catégories : ceux qui sont liposolubles et ceux qui sont hydrosolubles (annexe 5).

3.2.1. Les antioxydants non enzymatiques liposolubles :

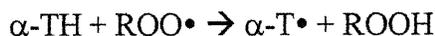
3.2.1.1. La vitamine E :

Le terme vitamine E désigne un groupe d'isomères divisés en deux catégories : les tocopherols et les tocotrienols. Il existe quatre tocopherols (α , β , γ , δ) et quatre tocotrienols (α , β , γ , δ) (Brigelius-Flohé *et al.* 1999).

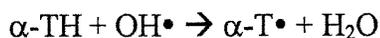
Une forme, l' α -tocopherol, est la forme la plus abondante dans la nature, mais c'est surtout celle qui présente l'activité biologique la plus élevée (Weiser *et al.* 1996).

D'une manière plus globale, la vitamine E possède plusieurs fonctions. L' α -tocopherol a des effets sur la signalisation intracellulaire, notamment en diminuant

l'activité de la protéine kinase C (Boscoboinik *et al.* 1991, Devaraj *et al.* 1996, Freedman *et al.* 1996, Koya *et al.* 1997 et 1998), certainement par atténuation de la libération des diacylglycerols provenant de la membrane (Kunisaki *et al.* 1994, Tran *et al.* 1994) ; il augmente aussi l'activité de la phosphoprotéine phosphatase 2A (Chan *et al.* 1998, Ricciarelli *et al.* 1998, Tran *et al.* 1996) et de la cyclooxygénase (Chan *et al.* 1998). L' α -tocopherol contrôle également l'expression des gènes de l' α -tropomyosine (Azzi *et al.* 1998). Ces effets sont indépendants de ses effets antioxydants, car le β -tocophérol, qui possède la même activité antioxydante, ne réalise aucune de ces fonctions décrites ci-dessus. La vitamine E joue également un rôle dans la fertilité (elle prévient la perte de la spermatogenèse chez les rats mâles et la perte des zygotes chez les rates femelles). Enfin, la vitamine E possède des effets antioxydants (Kamal-Eldin *et al.* 1996). Elle agit en brisant la chaîne de propagation de la peroxydation lipidique. Chaque molécule d' α -tocophérol (α -TH) peut réagir avec deux radicaux peroxylys pour former des hydroperoxydes organiques (Krinsky 1992) :



L' α -tocophérol peut également réagir avec le radical hydroxyl :



Le radical tocophéryl (α -T \cdot) n'est pas suffisamment réactif pour à son tour provoquer une peroxydation lipidique (Gille *et al.* 1995). Cependant, il a été observé que l'analogue hydrosoluble de la vitamine E, le Trolox C, a des effets pro-oxydants *in vitro* (Aruoma *et al.* 1991).

Le radical tocophéryl peut être régénéré par l'intervention d'un agent réducteur donneur d'un proton, comme l'acide ascorbique par exemple -bien qu'il subsiste un doute sur le fait que l'acide ascorbique réalise cette tâche *in vivo*- (Carr *et al.* 1999, Jore *et al.* 1989) :

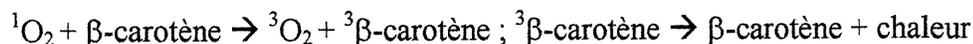
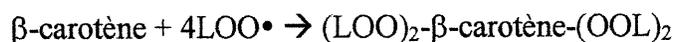


La vitamine E, possédant une extrémité hydrophile et une longue chaîne hydrophobe, peut facilement s'incorporer dans les membranes, ce qui privilégie son rôle de protecteur contre la peroxydation lipidique (Jore *et al.* 1989).

Par son pouvoir nucléophile, le γ -tocophérol peut capter les agents mutagènes électrophiles (comme le peroxydant), complétant ainsi l'action du glutathion qui possède aussi un pouvoir nucléophile (Christen *et al.* 1997, Cooney *et al.* 1993, 1995).

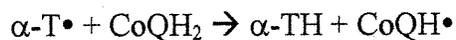
3.2.1.2. Les caroténoïdes :

Le β -carotène (pigment caroténoïde le plus abondant dans la nature) peut réagir avec plusieurs radicaux peroxylys ou alkoxylys lipidiques (Krinsky 1992), mais aussi avec des centaines de molécules d'oxygène singulet en captant leur énergie et en le dissipant sous forme de chaleur (Krinsky 1992, Schwartz *et al.* 1994) :



3.2.1.3. Le coenzyme Q10 :

Il s'agit d'une quinone (d'où son nom, ubiquinone), qui sous sa forme réduite (CoQH₂) peut régénérer le radical tocophéryl (α -T \cdot), mais aussi les radicaux peroxylys (LOO \cdot) et alkoxylys (LO \cdot) lipidiques (Kagan 1990, Krinsky 1992) :



Il faut savoir que certaines quinones, comme la ménadione, peuvent quant à elles être pro-oxydantes *in vitro* en produisant des espèces réactives de l'oxygène (Kehrer 1993).

3.2.1.4. La bilirubine :

C'est un produit terminal de la dégradation catabolique de l'hème qui peut inhiber la peroxydation lipidique en désactivant l'oxygène singulet et l'anion superoxyde (Morliere *et al.* 1994).

3.2.1.5. Autres molécules antioxydantes :

Dans l'industrie alimentaire, certains antioxydants sont utilisés comme conservateurs pour "briser la chaîne" de peroxydation. Il s'agit du hydroxyanisole butylé, du hydroxytoluène butylé, du propyl gallate, et de l'acide nordihydroguaiaretique (Halliwell *et al.* 1992). Ces molécules protègent les aliments par un mécanisme de type α -tocophérol :

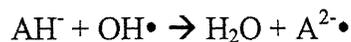
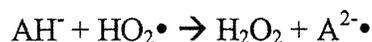
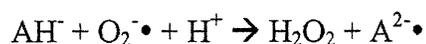


L'inconvénient de ces antioxydants "briseurs de chaîne" c'est qu'ils engendrent un radical, qui, même s'il est moins réactif que les espèces réactives qu'ils font disparaître, doit toujours être pris en compte (Halliwell *et al.* 1992). Un autre élément dont il faut tenir compte est le fait que beaucoup de ces antioxydants ont la propriété de lier les ions fer ferriques et de les réduire en fer ferreux (Halliwell *et al.* 1992). C'est le cas par exemple du propyl gallate.

3.2.2. Les antioxydants non enzymatiques hydrosolubles :

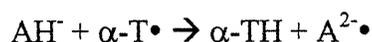
3.2.2.1. La vitamine C :

La vitamine C ou acide ascorbique (AH) montre plusieurs propriétés antioxydantes. Elle est capable de réagir avec l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroperoxyl (HO_2^{\cdot}), et le radical hydroxyl (OH^{\cdot}) (Gille *et al.* 1995) :



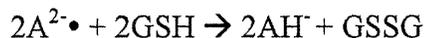
Elle peut réagir avec d'autres espèces réactives de l'oxygène et de l'azote : les radicaux alkoxy (RO^{\cdot}) et peroxy (ROO^{\cdot}), l'acide hypochloreux (HOCl), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet (1O_2), le dioxyde d'azote (NO_2^{\cdot}), le trioxyde et tetroxyde de diazote (N_2O_3/N_2O_4), l'oxyde nitrique (NO), le peroxy nitrite et l'acide peroxy nitreux ($ONOO^-/ONOOH$) (Carr *et al.* 1999).

La vitamine C peut également régénérer le radical tocophéryl ($\alpha-T^{\cdot}$) en α -tocophérol ($\alpha-TH$) (Gille *et al.* 1995, Jore *et al.* 1989) :



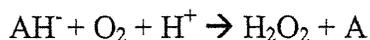
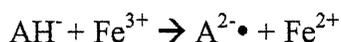
mais aussi d'autres molécules comme les radicaux thiyl/sulphenyl (RS^{\cdot}/RSO^{\cdot}), le radical urate (UH^{\cdot}), et le radical cation β -carotène ($\beta-C^{\cdot+}$) (Carr *et al.* 1999). La régénération de radical tocophéryl par l'ascorbate permet de déplacer les radicaux de la phase lipidique vers la phase aqueuse, prévenant ainsi la peroxydation lipidique induite par le radical tocophéryl (Neuzil *et al.* 1997).

La propriété antioxydante de la vitamine C est basée aussi sur le fait que le radical semidehydroascorbate ou ascorbyl ($A^{2-\cdot}$) a une faible réactivité (Bielski *et al.* 1975) et est régénéré en acide ascorbique ionisé (AH) par intervention d'agents réducteurs donneurs d'un proton, comme le NADH ou le glutathion réduit (GSH) (Halliwell *et al.* 1990) :



L'ascorbate (AH) peut également être régénéré à partir du radical ascorbyl ($A^{2\cdot}$) et de l'acide dehydroascorbique (DHA) par des voies enzymatiques faisant intervenir la semidehydroascorbate reductase NADH dépendante (Carr *et al.* 1999) et la selenoenzyme thioredoxine reductase NADPH dépendante (May *et al.* 1998).

Cependant, l'acide ascorbique peut avoir des effets pro-oxydants *in vitro* en apportant tous les éléments favorables à la réaction de Fenton (Fe^{2+} , H_2O_2) (Buettner *et al.* 1996, Halliwell 1996, Stadtman 1991) :



Dans les études récentes *in vivo* chez l'humain, l'ingestion simultanée de fer en présence d'acide ascorbique ne provoque pas de stress oxydant. Rehman *et al.* (1998) ont pu observer une diminution des dommages sur l'ADN au niveau des leucocytes pour le groupe ayant un niveau plasmatique en vitamine C élevé ; par contre, le groupe ayant un niveau plasmatique en vitamine C faible avaient de plus importants dommages sur l'ADN des leucocytes. De même, Berger *et al.* (1997) ont démontré que du plasma d'adultes, auquel on ajoute du fer en excès, ne possède pas de niveaux significativement élevés de peroxydation lipidique et ce quand l'acide ascorbique est présent à une concentration supérieure à 10 % de la concentration initiale (les niveaux élevés de peroxydation lipidique ne sont observés qu'en présence de niveaux faibles de vitamine C). Cela est également le cas lorsque l'on utilise le cuivre comme ion métal (Dasgupta *et al.* 1992).

Il existe des cas pathologiques où une surcharge en fer est liée à une augmentation des niveaux de peroxydation lipidique : il s'agit de l'hémochromatose et du traitement de la β -thalassémie (Livrea *et al.* 1996, Young *et al.* 1994). Il est intéressant de noter que, dans ces cas pathologiques, les niveaux de vitamine C plasmatiques sont significativement diminués (Livrea *et al.* 1996, Young *et al.* 1994). On peut penser, d'après les études *in vitro*, que la supplémentation en vitamine C chez ces patients soit

dangereuse, or il a été démontré, *in vivo*, que la présence simultanée de fer et d'acide ascorbique en concentration élevée diminue la peroxydation lipidique au niveau plasmatique et hépatique, alors que la présence de fer sans supplémentation en vitamine C provoque une peroxydation lipidique (Barja *et al.* 1994, Cadenas *et al.* 1998, Collis *et al.* 1997). Il semble donc bien qu'une supplémentation en acide ascorbique soit antioxydante *in vivo* dans les cas de surcharge en fer (par ingestion excessive ou par une pathologie). Pourquoi une telle différence entre les études *in vivo* et *in vitro* ? Le fer et l'ascorbate sont pro-oxydants *in vitro* et les études *in vivo* démontrent au contraire un effet antioxydant de la vitamine C en présence de fer. Des études *in vitro* ont montré un effet antioxydant de la vitamine C sur un modèle exposé à des ions fer (Miller *et al.* 1989, Minotti *et al.* 1987). En effet, la présence simultanée de fer ferrique (Fe^{3+}) et de fer ferreux (Fe^{2+}) dans un ratio de 1 est le meilleur modèle pro-oxydant (Miller *et al.* 1989, Minotti *et al.* 1987). Si ce ratio est modifié, dans un sens comme dans l'autre, la « force » pro-oxydante du fer est fortement diminuée, voire inhibée (Miller *et al.* 1989, Minotti *et al.* 1987). Ainsi, toute molécule modifiant l'état d'oxydo-réduction du fer sera d'une importance capitale suivant les proportions initiales de fer ferrique et de fer ferreux. Si le fer est présent principalement sous forme ferrique (Fe^{3+}), l'acide ascorbique, en le réduisant, augmentera les proportions de fer ferreux (Fe^{2+}), rapprochant ainsi le ratio vers 1. A ce niveau, on peut observer une peroxydation lipidique, et l'acide ascorbique est donc à ce niveau pro-oxydant. Mais, si l'on donne de fortes doses d'acides ascorbiques, une trop grande quantité de fer ferreux (Fe^{2+}) sera formée au détriment du fer ferrique (Fe^{3+}), et le ratio sera à nouveau trop éloigné de 1. A ce moment, l'acide ascorbique joue le rôle d'antioxydant (Miller *et al.* 1989, Minotti *et al.* 1987). Nous pouvons noter dans les études *in vivo* que de fortes doses de vitamine C sont antioxydantes en présence de fer, mais que dès que les niveaux sont bas, on peut observer nette augmentation de la peroxydation lipidique. Cela rejoint donc les études *in vitro* de Miller *et al.* (1989) et Minotti *et al.* (1987). Il s'agit donc de tenir compte des proportions entre le fer et l'ascorbate, afin de savoir si l'on désire obtenir des effets antioxydants ou pro-oxydants.

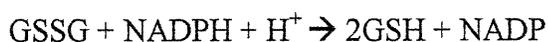
Un autre élément ne doit pas être oublié dans l'explication de la différence entre les résultats *in vivo* et *in vitro*. Il s'agit de la présence de protéines liant les métaux

(transferrine, ferritine, hémosidérine, ceruloplasmine). En effet, *in vivo* les niveaux d'ions métaux libres sont maintenus très bas car ils sont séquestrés par les protéines liant les métaux, alors qu'*in vitro*, l'on donne souvent les métaux sous forme libre (Halliwell *et al.* 1986b et 1996). Ainsi liés aux protéines, les métaux ne peuvent participer à la formation d'espèces réactives. Cependant, une diminution de pH (pH < 6), comme c'est le cas dans les tissus inflammés et/ou ischémiques, peut libérer les ions métaux de ces protéines, permettant ainsi d'être accessibles pour des réactions de peroxydation (Halliwell *et al.* 1986a et 1996). Il est également connu que le stress oxydant lui-même peut libérer les ions métaux de leur protéines. Ainsi, l'anion superoxyde peut libérer le fer de la ferritine (Biemond *et al.* 1984, Buettner *et al.* 1987) et le peroxyde d'hydrogène peut dégrader les protéines hémiques et ainsi libérer le fer de ces protéines (Gutteridge 1986, Puppo *et al.* 1988a et 1988b). Cela peut être rapproché à certaines pathologies, comme les maladies inflammatoires de l'intestin, où l'on peut observer des niveaux d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène élevés (voir paragraphe 5).

3.2.2.2. Le glutathion :

Le glutathion est un tripeptide (Glu-Cys-Gly) avec un groupement -SH sur la Cys. Il est présent en forte concentration dans les tissus, incluant l'intestin (Aw *et al.* 1992a et b). Il sert de cofacteur à différentes enzymes très variées, de tampon cellulaire redox, de substrat pour les enzymes antioxydantes (comme la glutathion peroxydase ou la dehydroascorbate reductase), et enfin de scavenger du radical hydroxyl et de l'oxygène singulet (Halliwell *et al.* 1991).

Comme nous l'avons vu, le glutathion réduit (GSH) sert de substrat à la glutathion peroxydase pour éliminer le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques (ROOH). Cela engendre du glutathion oxydé (GSSG), qu'il est nécessaire de réduire pour éviter les effets néfastes de ce premier. La réduction du GSSG en GSH est catalysée par la glutathion reductase (EC 1.6.4.2) en présence de NADPH + H⁺ (Gille *et al.* 1995).



En retour, le NADP résultant sera réduit, en tant que cofacteur, par la glucose-6-phosphate deshydrogénase de la voie des pentoses phosphates (Kehrer 1993, LeGrand *et al.* 1996).

L'intestin est capable de capter le glutathion luminal par un système de transport, ce qui permet de maintenir une concentration en glutathion intracellulaire minimale dans des conditions de stress oxydant (Aw 1994, Lash *et al.* 1986).

3.2.2.3. Les protéines liant les métaux :

Plusieurs d'entre elles réduisent les concentrations des métaux libres capables de réagir avec les hydroperoxydes. C'est le cas de la transferrine qui lie le fer dans le plasma ; elle se trouve en large excès (20 à 30% des protéines transferrines sont saturées en fer) de telle manière que le fer n'est jamais libre à pH 7,4 (Halliwell *et al.* 1986a). Dans la cellule par contre, le fer est lié à la ferritine ; cependant, le fer peut être libéré de la protéine par l'anion superoxyde ou par l'acide ascorbique (Halliwell *et al.* 1986b). Le cuivre peut également être lié à une protéine, la ceruloplasmine, évitant ainsi sa participation dans la formation de radicaux libres (Halliwell *et al.* 1986b).

La métallothioneine est capable de lier divers métaux lourds, par l'intervention de cystéines présentes dans sa structure (Morliere *et al.* 1992). Cette protéine permet donc de réguler les niveaux de cuivre et de zinc. Il a été observé une augmentation de la synthèse de cette protéine suite à une production croissante de radicaux libres. D'une part parce qu'elle empêche que les métaux entrent dans la formation de radicaux libres, et d'autre part parce qu'avec ses nombreuses cystéines, elle devient un bon scavenger de radicaux comme le radical hydroxyl (Thornalley *et al.* 1985).

L'hème et les protéines héminiques (hémoglobine et myoglobine) sont connues pour être facilement pro-oxydantes en réagissant avec le peroxyde d'hydrogène et en libérant le fer qu'elles contiennent (Halliwell *et al.* 1992, Krinsky 1992). Le fer ainsi libéré pourra entrer dans la formation du radical hydroxyl. Ainsi certaines protéines liant l'hème (l'hémopexine) ou les protéines héminiques (l'haptoglobine) peuvent avoir des

propriétés antioxydantes en formant des complexes rapidement évacués dans la circulation (Halliwell *et al.* 1992, Krinsky 1992).

3.2.2.4. Autres molécules antioxydantes :

D'autres molécules présentent des propriétés antioxydantes. C'est le cas de l'acide urique, produit du métabolisme de la purine, mais aussi de la créatinine qui agissent comme éboueurs (scavengers) de radicaux (Krinsky 1992).

Le mannitol, l'éthanol, et le diméthyl sulfoxyde sont généralement utilisés comme "scavengers" du radical hydroxyl *in vitro* (Halliwell *et al.* 1992). Toute molécule réagit avec ce radical à des taux constants de l'ordre de 10^9 à $10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à 37° C) (Halliwell *et al.* 1992). Il est donc préférable d'utiliser des molécules qui réagissent plus lentement comme l'urée (environ $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et le citrate (10^7 à $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et dans des concentrations bien supérieures à celles des molécules biologiques (Aruoma *et al.* 1988).

Certains phénols, spécialement les flavonoïdes, ont des propriétés antioxydantes (Halliwell *et al.* 1992). Mais cela est encore sujet à controverse, car certaines études ont montré au contraire qu'ils pouvaient avoir des effets pro-oxydants, notamment en réduisant le fer ferrique en fer ferreux ou en produisant des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène (Halliwell *et al.* 1992). Les dommages se font surtout sur des biomolécules non lipidiques comme l'ADN (Laughton *et al.* 1989).

Ainsi, les scientifiques sont de plus en plus d'accord sur le fait qu'un antioxydant peut fonctionner dans un système mais pas dans un autre.

Le cas des acides gras à chaîne courte (chaîne carbonée de 2 à 5 carbones) est particulièrement intéressant. Ces composés sont formés dans la lumière du tube digestif (essentiellement dans la partie distale) par la fermentation anaérobie bactérienne de composés alimentaires non digérés, comme les fibres alimentaires, l'amidon et les protéines non digérés (Velazquez *et al.* 1996b, Wolin 1981). Les acides gras à chaîne courte que l'on retrouve principalement dans le colon de mammifères, sont l'acétate, le

propionate et le butyrate (ils représentent 83 % des acides gras à chaîne courte totaux) (Demigné *et al.* 1985, Nyman *et al.* 1982, Rechkemmer *et al.* 1988). Leur ratio molaire est de 60:25:15 respectivement pour l'acétate, le propionate et le butyrate, mais il peut être changé par le type de fibres alimentaires, par l'amidon et les protéines. Les études montrent que les acides gras à chaîne courte ont des effets différents selon le modèle utilisé. En effet, il a été démontré qu'ils présentent des effets antiprolifératifs et différenciateurs (Awad *et al.* 1991, Czerniak *et al.* 1987, Kim *et al.* 1980, Otaka *et al.* 1989, Tsao *et al.* 1982, Velazquez *et al.* 1996a, Whitehead *et al.* 1986), ainsi que proapoptotique (Hague *et al.* 1993) sur les cellules cancéreuses, alors que sur des cellules saines, ils favorisent la prolifération cellulaire par leur effet trophique (Basson *et al.* 1998, Gibson *et al.* 1992 et 1999, Kripke *et al.* 1989, Sakata *et al.* 1984 et 1987, Schroder *et al.* 1999, Wilson *et al.* 1997). Parmi les acides gras à chaîne courte présents dans la lumière du tube digestif, il faut savoir que le butyrate possède le plus d'effets sur les colonocytes. Le propionate a des effets similaires, mais moins marqués. L'acétate ne possède pas d'effets similaires (Velazquez *et al.* 1996b). Parmi les actions intéressantes du butyrate, on peut noter une augmentation réversible de la perméabilité paracellulaire au niveau des cellules Caco-2, maximale après 72 h (Mariadason *et al.* 1997).

Depuis peu, quelques publications commencent à montrer que les acides gras à chaîne courte possèdent des effets antioxydants. En effet, il a été démontré que le butyrate et l'acétate pouvaient diminuer les dommages sur l'ADN, induits par le peroxyde d'hydrogène sur des cellules du colon (Abrahamse *et al.* 1999). Nous avons vu que les acides gras à chaîne courte ont la particularité de favoriser la différenciation cellulaire. Cela se traduit entre autre par une augmentation de l'expression de certaines protéines (comme la phosphatase alcaline -Gibson *et al.* 1999, Stein *et al.* 1996-). Ainsi, il est aisé de penser que l'expression des enzymes antioxydantes puisse être augmentée. Cela est le cas de la glutathion-S-transférase pi dont l'expression est augmentée dans les cellules Caco-2, suite à la supplémentation avec des acides gras à chaîne courte (l'effet le plus important est observé avec le butyrate) (Stein *et al.* 1996). En conséquence, la cellule intestinale peut augmenter l'expression des antioxydants endogènes, c'est-à-dire les antioxydants enzymatiques, ce qui augmenterait son pouvoir antioxydant. Cela pourrait expliquer, au moins en partie, le pouvoir antioxydant du butyrate.

4. Rappel sur l'absorption intestinale des lipides :

La majorité des lipides alimentaires sont les triglycérides ; les phospholipides représentent de plus petites quantités. La majorité des phospholipides se trouvant dans la lumière de l'intestin proviennent des sécrétions biliaires et des membranes des cellules desquamées. Enfin, la plus grande partie du cholestérol présent dans la lumière intestinale provient des sécrétions biliaires, une faible quantité provenant de l'alimentation.

4.1. Digestion intraluminale des lipides :

La digestion des graisses alimentaires est un processus complexe basé sur l'émulsification des lipides pour augmenter la surface de contact entre-eux et les enzymes lipolytiques. La digestion des lipides commence dans l'estomac où l'émulsion mécanique va avoir lieu et être maintenue par les lécithines intraluminales (Gargouri *et al.* 1989). La lipase intragastrique hydrolyse les lipides ; on estime que 20 à 30% de la totalité des lipides présents dans la lumière du tube digestif seront hydrolysés dans l'estomac (Abrams *et al.* 1988, Gooden *et al.* 1973, Moreau *et al.* 1988). Elle hydrolyse préférentiellement les liaisons esters des triglycérides en position Sn-3 (Abrams *et al.* 1988, Gooden *et al.* 1973, Moreau *et al.* 1988), et est résistante à la pepsine et ne nécessite aucun cofacteur (Bernback *et al.* 1987).

Par la suite, les lipides arrivent à l'intestin grêle où plusieurs événements prennent place. Tout d'abord, par la variation du pH entre l'estomac (pH 4.0 à 5.0) et le duodénum (pH 6.0 à 7.5), les acides gras vont passer d'un état protoné à un état ionisé (perte du proton), et ainsi migrer à la surface de l'émulsion, où en tant que particules chargées, ils favorisent la stabilité de l'émulsion mais aussi l'ancrage de la colipase sur cette dernière (Carey *et al.* 1983).

Le déversement de la bile dans le duodénum va permettre d'apporter plusieurs éléments importants dans la digestion des lipides, comme l'alcalinisation du pH et l'apport de Ca^{2+} , de sels biliaires et de phospholipides (O'Doherty *et al.* 1973).

Le pancréas va permettre l'apport d'enzymes lipolytiques. La lipase pancréatique hydrolyse les esters aux positions Sn-1,3 des triglycérides engendrant ainsi l'apparition de β -(Sn-2) monoglycérides ; elle possède peu d'activité sur les esters de stérols, les phospholipides ou les monoglycérides (Borgström 1980, Blackberg *et al.* 1981). La colipase pancréatique permet la liaison de la lipase pancréatique sur l'émulsion lipidique. La liaison colipase-lipase permet une configuration optimale qui expose le site actif de l'enzyme, permettant la liaison avec le substrat et l'initiation de la lipolyse (Donner *et al.* 1976). La phospholipase A_2 pancréatique s'attaque à l'ester Sn-2n des phospholipides, produisant un lysophospholipide et un acide gras (Dijkstra *et al.* 1981) ; cette enzyme nécessite des ions Ca^{2+} . Les substrats de la cholestérol estérase pancréatique sont les triglycérides et les esters de vitamines liposolubles, mais surtout les esters des stérols (Lombardo *et al.* 1978, 1980a et 1980b). Cette enzyme nécessite absolument la présence d'acides biliaires en tant que cofacteurs. On peut la détecter dans les entérocytes par immunocytochimie (Lechene de la Porte *et al.* 1987).

Les produits de l'hydrolyse des triglycérides (les monoglycérides et les acides gras) s'accumulent pour former des produits lamellaires à la surface des émulsions lipidiques, formant ainsi d'abondantes vésicules par l'intervention des sels biliaires (Neiderhiser *et al.* 1970). Les produits de la lipolyse les plus hydrophobes logeront profondément dans le cœur de la micelle, ce qui leur permet de traverser le milieu aqueux de la lumière intestinale pour se rendre jusqu'aux microvillosités.

Le cas des triglycérides à chaîne moyenne (TCM ; avec des groupements acyls gras de 6 à 12 carbones) est intéressant. En effet, contrairement aux triglycérides à chaîne longue, les TCM sont plus hydrosolubles, facilitant ainsi leur émulsification et leur hydrolyse puis leur absorption par les cellules de l'épithélium gastrique et intestinal (Linscheer *et al.* 1994). Ceci est une des raisons pour laquelle on les utilise dans des cas de malabsorption des graisses.

Dans le même ordre d'idée, les acides gras à chaîne courte (provenant de la fermentation bactérienne des fibres alimentaires non absorbées au niveau de l'intestin grêle, mais aussi du lait), sont absorbés par les colonocytes et jouent un rôle très important dans l'équilibre physiopathologique de ces cellules (rôles énergétique, dans l'absorption des électrolytes, mais aussi dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules intestinales et particulièrement du colon) (Velazquez *et al.* 1997, von Engelhardt *et al.* 1998).

Enfin, les stérols provenant des plantes jouent un rôle important dans l'absorption du cholestérol, dans le sens où ces phytostérols réduisent son absorption (Ikeda *et al.* 1988). Ainsi, l'ajout de β -sitostérol au cholestérol contenue dans les micelles diminue l'absorption du cholestérol (Field *et al.* 1997).

Les produits de la lipolyse auront à traverser la couche d'eau non-agitée (unstirred water-layer) avant de pouvoir passer la membrane apicale des entérocytes (Van Greevenbroek *et al.* 1998). C'est cette étape qui limite le taux d'absorption des produits digestifs.

4.2. Evénements intracellulaires :

4.2.1. Passage de la membrane apicale vers le réticulum endoplasmique :

Le passage des produits de la lipolyse à travers la membrane apicale des entérocytes (bordure en brosse) s'effectue grâce à un gradient de concentration favorable à la diffusion de ces particules (Westergaard *et al.* 1974 et 1976). Bien qu'il s'agisse là d'un passage de particules lipophiles à travers une bicouche phospholipidique amphipatique, il existe des transporteurs spécifiques au sein des membranes apicales des entérocytes. C'est le cas pour les acides gras à chaîne longue qui possèdent un transporteur membranaire saturable : la « microvillus membrane fatty acid-binding protein » (MVM-FABP ; 40 kDa) (Stremmel *et al.* 1985).

Une fois la membrane apicale traversée, la prochaine destination pour les produits de la lipolyse est le réticulum endoplasmique lisse pour leur ré-esterification. Cependant, il reste le compartiment cytosolique à traverser, et parce qu'il est aqueux, il faut la présence de transporteurs intracellulaires.

Dans le cas des acides gras à chaîne longue, les « fatty acid-binding proteins » (FABP ; 15 kDa) assurent ce rôle. Les entérocytes expriment deux isoformes de FABP : la I-FABP (I pour intestinal) et la L-FABP (L pour liver). La lettre se rapporte à l'organe où la protéine a été découverte pour la première fois. Les ARN messagers codant pour ces protéines sont très abondants dans l'entérocyte (ils représentent 2 à 3 % de toutes les protéines traduites dans l'intestin) ; la L- et la I-FABP représentent également une grande proportion de toute la masse des protéines cytosoliques (1 à 2 %) (Bass *et al.* 1985 a et b, Ockner *et al.* 1974, 1982). Le gène codant pour la L-FABP est localisé sur le chromosome 2 alors que celui codant pour la I-FABP est localisé sur le chromosome 4 (Sweetser *et al.* 1987). L'abondance des transcripts de la I-FABP dans le colon représente 8 % des niveaux détectés dans l'intestin grêle, alors que dans l'estomac et le foie, ils représentent 2 à 4 % (Gordon *et al.* 1985). Pour la L-FABP, son expression dans l'estomac et le colon représente 2 à 6 % des niveaux trouvés dans l'intestin (Gordon *et al.* 1985). La L-FABP possède une plus haute affinité pour les acides gras polyinsaturés que pour les acides gras saturés, alors que la I-FABP a autant d'affinité pour les acides gras polyinsaturés que pour les acides gras saturés (Gordon *et al.* 1985). En outre, la capacité de transport de ces deux protéines est différente : la L-FABP peut transporter deux moles d'acides gras par mole de protéine, alors que la I-FABP transporte dans une stœchiométrie de 1:1 (Gordon *et al.* 1985).

Ainsi, quelques heures après l'ingestion d'un repas gras (deux heures), le cytoplasme est rapidement engorgé de gouttelettes lipidiques (annexe 6).

Le cholestérol se trouvant dans les cellules épithéliales intestinales peut avoir diverses origines. Du pôle apical, il provient du bolus alimentaire. Du pôle basolatéral, le cholestérol prend sa source des LDL (low density lipoproteins) circulantes. Ces dernières pénètrent dans la cellule par le biais des récepteurs (les entérocytes expriment

le récepteur aux LDL sur les membranes basolatérales) (Pittman *et al.* 1982). Le cholestérol peut enfin provenir de la synthèse *de novo* de cholestérol à partir d'acétyl CoA. Ce processus fait intervenir plusieurs enzymes, dont la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA reductase), enzyme clé limitante dans la synthèse de cholestérol. L'intestin est la deuxième source de cholestérol néosynthétisé par organe, derrière le foie.

Le cholestérol provenant de la lumière intestinale devra lui aussi faire appel à un transporteur pour traverser le compartiment cytosolique et se rendre au réticulum endoplasmique lisse. Cette fonction est assurée par la « sterol carrier protein-2 » (SCP₂ ; 13,5 kDa) (Chanderbhan *et al.* 1982, Sviridov 1999). La majorité de la SCP₂ se trouve dans les mitochondries avec des quantités plus faibles dans la membrane apicale.

La néosynthèse de cholestérol au niveau de l'entérocyte se fait principalement au niveau du réticulum endoplasmique (Field *et al.* 1982). L'HMG-CoA reductase est régulée par son état de phosphorylation. En effet, la forme inactive de l'enzyme est sous forme phosphorylée ; la forme déphosphorylée étant la forme active (Field *et al.* 1982). Gebhard *et al.* (1985) a démontré que seulement 15 % de l'activité totale de cette enzyme est sous forme inactive dans l'intestin humain, suggérant que la majorité de l'HMG-CoA reductase existe sous forme déphosphorylée ou active *in vivo*. La synthèse de cholestérol est également dépendante de l'entrée de cholestérol dans la cellule par les côtés apical et basolatéral. Dans ce cas, on observe une diminution de la synthèse *de novo* de cholestérol (Field *et al.* 1990).

Le cholestérol synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique va être ensuite dirigé vers la membrane plasmique pour y être stocké (Field *et al.* 1998b, Kaplan *et al.* 1985). Ce processus ne fait pas intervenir l'appareil de Golgi, les microtubules ou la synthèse de protéines (Field *et al.* 1998b). Par contre, le transport du cholestérol de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique (pour y être estérifié et entrer dans l'assemblage des lipoprotéines) est quant à lui dépendant de la p-glycoprotéine (Lange 1994, Field *et al.* 1998b). Ces deux voies de transport semblent donc être indépendantes l'une de l'autre et régulées de manière différente.

Il a été démontré que le cholestérol provenant des micelles de la lumière intestinale et le cholestérol néo-synthétisé vont aller dans la membrane plasmique (Field *et al.* 1995). Ils ne sont donc pas directement dirigés vers le réticulum endoplasmique. En effet, après l'absorption de cholestérol exogène, le cholestérol de la membrane plasmique se déplace vers des microdomaines résistants aux détergents, puis est transporté vers le réticulum endoplasmique pour y être estérifié et entrer dans l'assemblage des lipoprotéines (Field *et al.* 1998a). Les cavéolines ont été localisées dans ces microdomaines ; elles semblent donc être impliquées dans le transport du cholestérol de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique. En outre, des traitements qui perturbent les fonctions des cavéolines perturbent également le transport du cholestérol de la membrane plasmique vers le réticulum endoplasmique (Field *et al.* 1998a).

4.2.2. Evénements observés au sein du réticulum endoplasmique :

Au niveau du réticulum endoplasmique, plusieurs événements vont également avoir lieu. Les acides gras vont permettre la re-estérification des monoglycérides grâce à l'intervention de la monoacylglycerol acyltransferase et de la diacylglycerol acyltransferase et de l'acyl CoA-synthétase (Rao *et al.* 1966) (annexe 7). Ces enzymes sont présentes dans le réticulum endoplasmique lisse (Brindley *et al.* 1965). Il s'agit de la voie du 2-monoacylglycerol ; cette voie est prédominante dans la synthèse intestinale des triglycérides lors d'ingestion de lipides. Il existe une autre voie de synthèse des triglycérides qui a lieu pendant la période de jeûne : il s'agit de la voie du glycerol-3-phosphate qui, comme son nom l'indique, utilise le glycerol-3-phosphate provenant du métabolisme du glucose (annexe 7). Dans cette voie, deux acyls-CoA sont attachés au glycerol-3-phosphate par la α -glycerophosphate CoA acyltransferase (Field *et al.* 1995). L'acide phosphatidique résultant est ensuite transformé en diglycéride puis réacylé avec un troisième acyl-CoA gras pour donner un triglycéride (Field *et al.* 1995). L'enzyme est associée au réticulum endoplasmique granuleux plutôt qu'au réticulum endoplasmique lisse (Higgins *et al.* 1971).

La synthèse des phospholipides fait également intervenir deux voies de synthèse : la voie de l'acide phosphatidique-phosphorylcholine et la voie de réacylation des lysophospholipides absorbés. La première fait intervenir l'acide phosphatidique, synthétisé à partir du glycerol-3-phosphate provenant du métabolisme du glucose, et la CDP-choline alimentaire et biliaire (Mansbach 1977) (annexe 8). La deuxième voie nécessite l'intervention de la lysophosphatidylcholine acyl transférase, qui permet la re-estérification de la lysophosphatidylcholine en phosphatidylcholine (Parthasarathy *et al.* 1974) (annexe 8).

Comme nous l'avons vu, le cholestérol de la membrane plasmique se dirige vers le réticulum endoplasmique pour y être estérifié. L'enzyme responsable de cette action est l'acyl-coenzymeA cholestérol acyltransférase (ACAT) (Haugen *et al.* 1976). Gavey *et al.* (1983) ont proposé que la forme active est phosphorylée, et que la déphosphorylation inactive l'enzyme. Cependant, cette hypothèse demeure controversée (Field 1984a).

L'enzyme pancréatique, la cholestérol estérase, se trouvant dans le cytosol des entérocytes peut aussi participer à l'estérification du cholestérol (Field 1984b). Bien que cette enzyme hydrolyse le cholestérol ester dans la lumière de l'intestin, il a été démontré qu'à pH 5,0 à 6,0, la cholestérol estérase montre une activité inverse, c'est à dire la capacité d'estérifier le cholestérol (Gallo *et al.* 1984).

La synthèse des apolipoprotéines se passe également dans le réticulum endoplasmique, et plus précisément le réticulum endoplasmique granuleux (Christensen *et al.* 1983). Les apolipoprotéines synthétisées par l'entérocyte sont l'apo AI, l'apo AIV, l'apo B48, l'apo B100, l'apo CII et l'apo CIII (tableau 1) (Breslow *et al.* 1985). Chaque apolipoprotéine est impliquée dans une fonction bien précise au sein de sa lipoprotéine.

Apolipoprotéine	Rôle	Lipoprotéines	Sites d'expression
AI	Cofacteur de la lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT).	Chylomicrons et les HDL.	Intestin et foie.
AIV	Permet le transport inverse du cholestérol, régulation de l'appétit.	Chylomicrons et les HDL.	Exclusivement par l'intestin humain.
B100	Permet la liaison avec le récepteur des LDL.	VLDL, les IDL et les LDL	Principalement par le foie.
B48	Permet le transport des lipides alimentaires de l'intestin vers le foie.	Chylomicrons.	Intestin.
CII	Activateur de la lipoprotéine lipase.	Chylomicrons, les VLDL, les IDL et les HDL.	Foie.
CIII	Inhibiteur de la lipoprotéine lipase (?).	Chylomicrons, les VLDL, les IDL et les HDL.	Intestin et foie.

Tableau 1 : Rôles, association aux lipoprotéines et site d'expression des apolipoprotéines (Yamada 1991).

Il existe encore des doutes sur la présence de l'apo AII et l'apo CI dans l'intestin (Li *et al.* 1988).

Le cas de l'apo B48 et l'apoB100 est particulièrement intéressant car elles sont le produit du même gène (Cartwright *et al.* 1998). Ce mécanisme dépend de l'« editing » de l'ARNm de l'apoB. Ainsi, deux espèces d'apo B sont générées par la conversion de la cytidine en position 6666 de l'ARNm en uridine (Powell *et al.* 1987). Cette conversion fait intervenir une déamination catalysée par une enzyme qui est le produit du gène APOBEC-1 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide # 1) (Harris *et al.* 1993, Scott *et al.* 1994, Smith *et al.* 1991). Cela introduit donc un codon stop (UAA) au lieu du codon glutamine d'origine (CAA) à l'acide aminé 2153 entérocytaire (Van Greevenbroek *et al.* 1998). La traduction de l'ARNm en résultant donnera un protéine de 2152 acides aminés, représentant les 48 % du côté N-terminal de l'apoB100 (4536 acides aminés). Le nom apo B48 a donc été donné à cette protéine de 2152 acides aminés parce qu'elle représente 48 % de l'apoB100 en terme d'acides d'aminés.

Un quantité considérable d'ARNm d'apo B est transcrit, puis traduit, en apo B dans le réticulum endoplasmique, pour servir à la formation des lipoprotéines suite à l'arrivée de lipides dans l'entérocyte (Van Greevenbroek *et al.* 1998).

Par la suite, les apolipoprotéines vont se diriger du réticulum endoplasmique granuleux vers le réticulum endoplasmique lisse (Christensen *et al.* 1983).

L'apo B est une protéine qui possède des séquences hydrophobes, ce qui lui permet de se « transloquer » à travers la membrane du réticulum (Van Greevenbroek *et al.* 1998). L'addition de lipides permet une solubilisation et une stabilisation du complexe protéine/lipide. L'intervention de deux protéines permet la formation du complexe ; il s'agit de la « microsomal triglyceride transfer protein » (MTP, 88 kDa) et de la « protein disulfide isomerase » (PDI) (Van Greevenbroek *et al.* 1998). Le MTP permet le transfert de lipides neutres dans les lipoprotéines naissantes ; le PDI est une protéine ubiquitaire qui permet la formation de liaisons disulfides dans les protéines naissantes (figure 2). L'absence de MTP, comme c'est le cas dans l'abetalipoprotéïnémie, provoque l'annulation de la sécrétion des lipoprotéines contenant l'apo B (Wetterau *et al.* 1992).

Il a été observé que des conditions qui augmentent la sécrétion de l'apo B (comme l'ajout d'acide oléique, de phosphatidylcholine, ou de lysophosphatidylcholine), n'altèrent ni la masse, ni l'activité, ni l'expression génique du MTP (Mathur *et al.* 1997). De même, des conditions qui diminuent la sécrétion de l'apo B (comme l'ajout de sphingomyelinase, de trifluoperazine, de verapamil, d'acide okadaïque, de vanadate ou de monensine) ne modifient ni l'activité ni la masse du MTP (Mathur *et al.* 1997). D'autres travaux sont nécessaires pour comprendre l'assemblage et la sécrétion des chylomicrons.

Si les lipides ne sont pas correctement complexés aux protéines, ou tout simplement s'il n'y a pas de lipides provenant de la lumière intestinale, les apolipoprotéines en excès seront dégradées dans la lumière du réticulum endoplasmique par des protéases (étape IV et V de la figure 2).

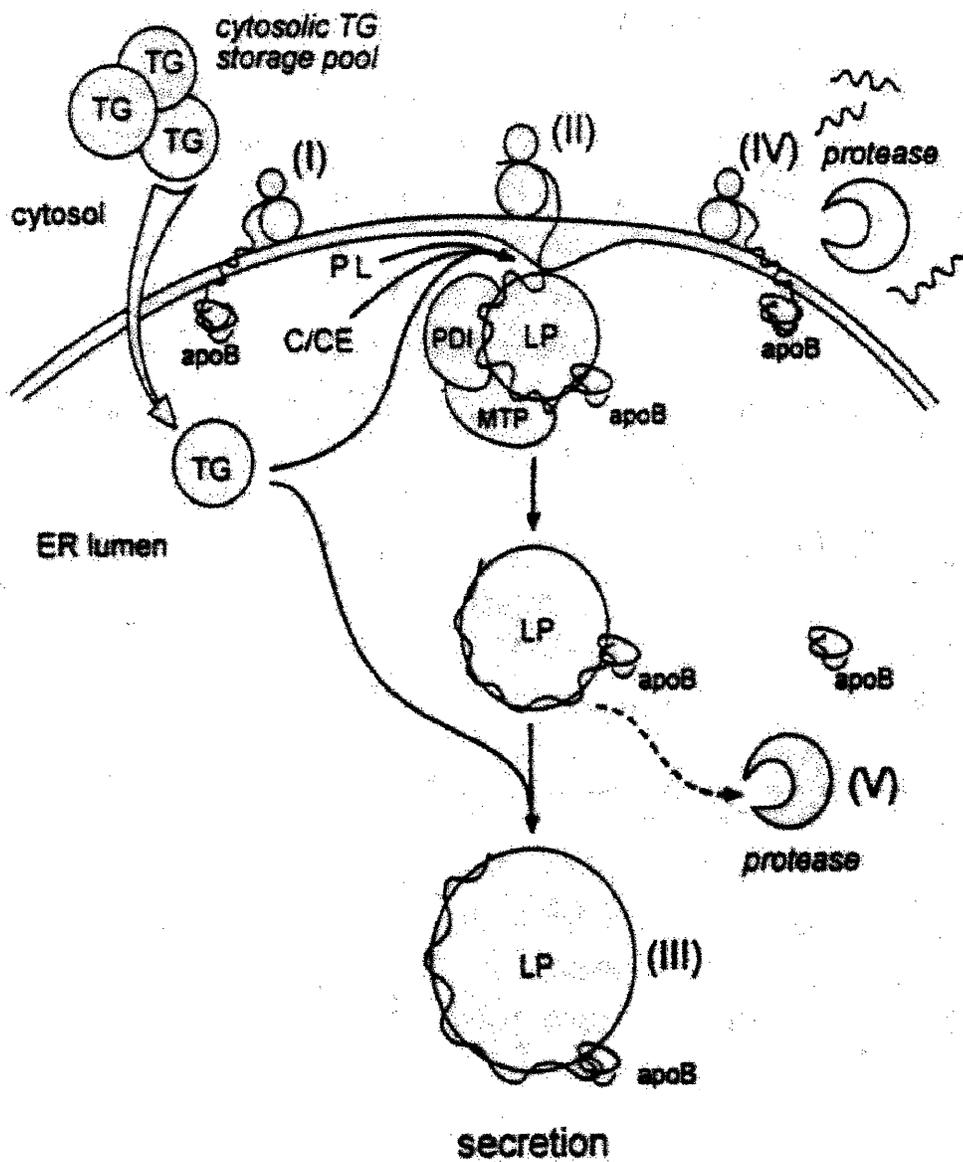


Figure 2 : Assemblage intracellulaire des lipoprotéines (Van Greevenbroek *et al.* 1998).

L'appareil de Golgi va commencer à se remplir de gouttelettes lipidiques correspondant aux lipoprotéines naissantes. Les vésicules Golgiennes vont se diriger vers la membrane basolatérale pour y fusionner, et libérer ainsi les lipoprotéines dans la circulation lymphatique mésentérique (Sabesin *et al.* 1977, Tytgat *et al.* 1971) (annexe 9). Les microtubules du cytosquelette sont impliquées dans le phénomène d'exocytose des lipoprotéines (Glickman *et al.* 1972 et 1976). Il est intéressant de noter les protéines du cytosquelette peuvent être la cible du stress oxydant, notamment par la présence de groupements -SH au niveau des sites fonctionnels de la tubuline (Neely *et al.* 1999, Olivero *et al.* 1990, VanWinkle *et al.* 1994). Les chylomicrons naissants, contenant principalement l'apo B48, l'apo AIV et l'apo AI, vont subir une série de modifications. Les HDL présentes dans la lymphe vont céder aux chylomicrons des apo E, apo CII, et apo CIII. Par la suite, les apo AI et apo AIV seront transférées aux HDL (Tall *et al.* 1979). Au niveau de la circulation sanguine, les chylomicrons résiduels (provenant de leur délipidation par l'intervention de la LPL) seront dirigés vers le foie et captés par le récepteur des lipoprotéines résiduelles (ou récepteur à l'apo E).

Plusieurs éléments sont capables de modifier la sécrétion des lipoprotéines au niveau de l'intestin. En effet, il a déjà été démontré que l'état d'insaturation des acides gras ingérés modifie la taille des chylomicrons : la taille de ces derniers augmente quand l'insaturation des lipides augmente (Feldman *et al.* 1983). Ainsi, quand un acide gras saturé, comme l'acide palmitique, est absorbé au niveau de l'intestin, on peut observer de plus petits chylomicrons au niveau lymphatique que si un acide gras polyinsaturé est absorbé (Ockner *et al.* 1969).

Les triglycérides, et les phospholipides sont capables de stimuler la sécrétions de lipoprotéines riches en triglycérides (Field *et al.* 1995). Il a également été démontré que la synthèse de cholestérol ester joue un rôle inducteur dans la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides. En effet, l'inhibition de l'ACAT interférait sur le transport et la sécrétion normale des lipoprotéines riches en triglycérides (Kam *et al.* 1989). Cependant, des données plus récentes vont à l'encontre de l'importance de la synthèse de cholestérol ester dans la sécrétion normale des triglycérides et de l'apo B pas l'intestin (Field *et al.* 1991). De plus, la sécrétion d'apo B peut être augmentée dans des conditions expérimentales où la synthèse de cholestérol ester est diminuée (Field *et al.* 1994). D'un

autre côté, la sécrétion d'apo B peut être diminuée quand la synthèse de cholestérol ester est augmentée (Field *et al.* 1993). Tous ces résultats démontrent que la sécrétion des triglycérides et de l'apo B ne dépend pas de la synthèse de cholestérol ester, mais que dans certaines conditions, la disponibilité du cholestérol ester peut devenir un facteur limitant (Kam *et al.* 1989).

L'intestin est capable de former différentes lipoprotéines. Il s'agit des chylomicrons (CM), des VLDL, des LDL et des HDL (Green *et al.* 1978, Windmueller *et al.* 1968) (annexe 10). Les CM sont formés pendant les périodes d'absorption des lipides. Par contre, les VLDL sont formées en plus durant les périodes de jeûne. Ces deux types de lipoprotéines sont principalement composées de triglycérides, mais aussi de phospholipides. Des particules LDL ont déjà été isolées des entérocytes (Magun *et al.* 1988), ainsi que des particules HDL (Magun *et al.* 1985).

4.3. Particularités des cellules Caco-2 :

Les cellules Caco-2 sont une lignée cellulaire dérivée d'un adénocarcinome colique humain (Levy *et al.* 1995, Hughes *et al.* 1987). Elles ont la particularité de se différencier spontanément et d'acquérir ainsi un phénotype entérocytaire 20-30 jours après leur confluence. Il apparaît alors une polarité au niveau de la cellule qui est caractérisée par des microvillosités (bordure en brosse) du côté apical où l'on peut observer des hydrolases et par un noyau situé du côté basolatéral (Levy *et al.* 1995, Hughes *et al.* 1987). Les cellules Caco-2 ont la capacité de produire des jonctions serrées entre elles au cours de leur différenciation, favorisant ainsi la formation d'une monocouche. Cette propriété est très importante et très utile, car à l'aide de membranes microporeuses (qui permettent de séparer le côté apical du côté basolatéral - annexe 11-), il est possible d'étudier le transport et le métabolisme de certaines molécules à travers les cellules Caco-2. C'est le cas du fer (Alvarez-Hernandez *et al.* 1991), du glucose (Blais *et al.* 1987, Cogburn *et al.* 1991), des acides aminés (Hidalgo *et al.* 1990a, Nicklin *et al.* 1992), des vitamines (Dix *et al.* 1990), des acides biliaires (Hidalgo *et al.* 1990b), du phosphate

inorganique (Mohrman *et al.* 1986) et d'autres substances (Artursson 1990, Artursson *et al.* 1990). Le transport à travers la monocouche cellulaire peut faire intervenir un passage intracellulaire (passage à travers la cellule) ou un passage paracellulaire (entre les cellules).

Il a été observé que les cellules Caco-2 cultivées sur un support perméable se différencient plus rapidement (Moberly *et al.* 1990), sécrètent plus d'apolipoprotéines et de lipides (Wagner *et al.* 1992), et "éditent" plus de messagers d'apoB (Giannoni *et al.* 1994, Jiao *et al.* 1990).

Les cellules Caco-2 ont un métabolisme des lipides qui commence à être bien compris et qui possède certaines particularités qui méritent que l'on s'y attarde. Les cellules Caco-2 peuvent synthétiser l'apo B100 et l'apo B48, mais il a été démontré que lorsqu'elles sont cultivées sur des flasques en plastique, elles produisent essentiellement de l'apo B100 (Hughes *et al.* 1988, Lee *et al.* 1988). Par contre, quand elles sont mises en cultures sur filtres, la sécrétion d'apo B48 est majoritaire devant celle de l'apoB100 (Jiao *et al.* 1990). Les cellules Caco-2 peuvent également synthétiser l'apo AI, l'apo AIV, l'apo C et l'apo E (Dashti *et al.* 1990, Hughes *et al.* 1987, Traber *et al.* 1987, Wagner *et al.* 1992), et leur synthèse est bien souvent dépendante de l'état de différenciation. En effet, il a été observé que la sécrétion de l'apo AI est augmentée au cours de la différenciation des cellules Caco-2 (Reisher *et al.* 1993). De même, l'expression des ARN messagers de l'apo AI, de l'apo AIV, de l'apo CIII, et de l'apo E est augmentée au cours de la différenciation cellulaire (Reisher *et al.* 1993).

Les cellules Caco-2 expriment la L-FABP, mais pas ou très peu la I-FABP (Sweetser *et al.* 1987). En outre, il a été démontré que l'activité de la monoacylglycerol acyltransferase dans les cellules Caco-2 ne représente que 7 % de celle observée dans le jéjunum de rat (Levin *et al.* 1992, Trotter *et al.* 1993). Ainsi, la voie majoritaire d'estérification des lipides est la voie du glycerol-3-phosphate (Trotter *et al.* 1993). Il a été proposé que la I-FABP était impliquée dans l'orientation des acides gras vers la voie du monoacylglycérol pour la synthèse de triglycérides (Lowe *et al.* 1993). Ainsi, la faible activité de la voie du monoacylglycérol dans les cellules Caco-2 pourrait être reliée au fait que ces cellules expriment peu la I-FABP (Field *et al.* 1995).

Comme les cellules intestinales, les cellules Caco-2 absorbent le cholestérol à partir de micelles et l'estérifient par l'intermédiaire de la ACAT (Field *et al.* 1987). L'activité de l'HMG-CoA reductase et l'expression du récepteur aux LDL sont similaires à celles observées dans les entérocytes (Field *et al.* 1991 et 1993).

5. Stress oxydant au niveau de l'intestin :

5.1. Les causes du stress oxydant au niveau de l'intestin :

L'intestin possède la particularité de se trouver à l'interface entre l'environnement extérieur (la lumière intestinale) et l'intérieur de l'organisme. Il assure d'ailleurs le rôle de barrière sélective, c'est à dire qu'il favorise l'entrée des nutriments dans la circulation systémique, mais aussi qu'il évite la pénétration de molécules ou d'organismes étrangers indésirables. La muqueuse intestinale est donc constamment exposée à des oxydants, à des mutagènes et des carcinogènes provenant de l'alimentation ou générés par des réactions endogènes (Ames 1983, Aw 1999). Parmi ces substances néfastes, on trouve les hydroperoxydes lipidiques, produits des acides gras polyinsaturés peroxydés présents dans certains aliments (hamburger, frites, ...) (Aw 1999, Girotti *et al.* 1985, Sevanian *et al.* 1985). L'accumulation d'hydroperoxydes lipidiques diminue les niveaux de glutathion intracellulaire, ce qui fait pencher l'équilibre de la cellule vers un état oxydant (Cepinskas *et al.* 1994). Il existe d'autres substances alimentaires qui peuvent avoir une action pro-oxydante, comme une diète élevée en poivre de cayenne, en lipides ou en éthanol qui augmente la production d'anion superoxyde, de radical hydroxyl au niveau de la muqueuse intestinale de rats, engendrant ainsi une peroxydation lipidique et un fragmentation de l'ADN (tableau 2) (Bagchi *et al.* 1998). En outre, une augmentation de la viscosité membranaire a été observée.

Dans certaines pathologies intestinales, il a été observé des niveaux de stress oxydant supérieurs à ceux que l'on observe habituellement (Grisham *et al.* 1992, Lih-Brody *et al.* 1996, Mahida *et al.* 1989, Middleton *et al.* 1993, Simmonds *et al.* 1992, Williams *et al.*

1990). En effet, les maladies inflammatoires intestinales sont propices à créer un environnement pro-oxydant, car les espèces réactives de l'oxygène sont des composants importants de l'inflammation. Ces dernières sont produites majoritairement par les cellules phagocytaires activées dans le but de détruire les organismes envahisseurs, mais aussi pour attirer d'autres cellules immunitaires au niveau de l'inflammation (rôle chimiotactique) (Yamada *et al.* 1991, Kehrer 1993). Les espèces réactives de l'oxygène produites par les cellules phagocytaires sont surtout l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (Kehrer 1993). Ces derniers sont formés grâce à la NADPH oxydase membranaire des neutrophiles, des monocytes, des éosinophiles et des macrophages, mais aussi grâce à la xanthine oxydase des bactéries et des cellules épithéliales intestinales desquamées lors de l'inflammation (cette dernière enzyme fournit 20% d'anion superoxyde et 80% de peroxyde d'hydrogène) (Parks *et al.* 1986, Weiss 1986).

Comme nous l'avons vu, les ions métaux ne sont jamais libres à pH physiologique, que ce soit dans la cellule ou dans le milieu extracellulaire. Seule une diminution de pH ($\text{pH} < 6$) peut libérer les ions métaux de ces protéines, comme c'est le cas dans les tissus inflammés et/ou ischémiques (Halliwell *et al.* 1986a et 1996). Ces ions métaux ainsi libérés peuvent agir avec l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène produits par les cellules phagocytaires, et ainsi engendrer le très réactif radical hydroxyl, exacerbant ainsi les effets pro-oxydants des cellules phagocytaires (tableau 2) (Halliwell *et al.* 1986a, Kehrer 1993). La majorité des cellules phagocytaires impliquées dans ce processus sont des neutrophiles, et plus particulièrement les neutrophiles polymorphonucléaires (PMN). Ces PMN ont en plus la particularité de contenir la myeloperoxydase, enzyme qui catalyse l'oxydation des ions halides, en présence de peroxyde d'hydrogène, pour former des acides hypohaleux (principalement hypochloreux), qui sont de puissantes espèces réactives (Kehrer 1993).

A partir de ce moment, un cercle vicieux est enclenché (figure 3). Les cellules phagocytaires se trouvent donc maintenant sur le lieu de l'inflammation, libérant leurs espèces réactives, mais aussi des hydrolases, des protéases, des phosphatases ; l'ensemble participe à l'atteinte du tissu épithélial (Kehrer 1993). En réponse, le tissu ainsi atteint va sécréter des facteurs de recrutement et d'activation des phagocytes (eicosanoïdes, leucotriènes, interleukines, histamine,...). Ces derniers vont eux aussi

libérer des espèces réactives, mais vont également favoriser la libération d'autres agents (prostaglandines, leucotriènes, hydroperoxydes) qui vont augmenter l'inflammation (Kehrer 1993). Il est intéressant de noter que les cellules intestinales peuvent également avoir une action bactéricide sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* en utilisant des espèces réactives de l'oxygène (principalement l'anion superoxyde) (Deitch *et al.* 1995) de la même manière que les PMN.

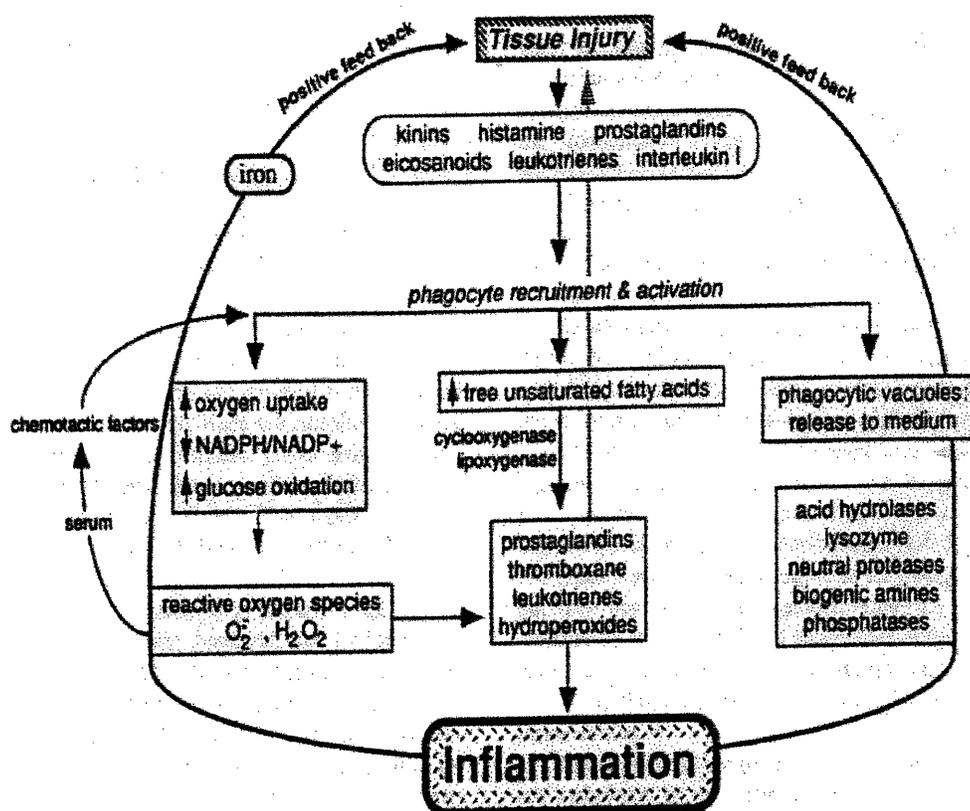


Figure 3 : Rôle des espèces réactives dans l'inflammation (Kehrer 1993).

Molécules	Pro-oxydants	Effets	Antioxydants		Références
			Molécules	Effets	
Fer (colon de rat).	↑ peroxydation lipidique dans le fote, mais pas dans colon. ↑ cryptes aberrantes.		Vitamine E.	Correction des effets pro-oxydants.	Wright <i>et al.</i> 1999
Fer (colon de rats).	Aucun effet sur : [Cu] et [Mn] ; SOD, GSH-Px, GST et céruloplasmine ; peroxydation lipidique ; prolifération cellulaire ; nombre de cryptes anormales.				Soyars <i>et al.</i> 1998
Fer (oesophage-duodénum de rats).	↑ adénomes oesophagiens. ↑ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. ↑ groupements carbonyles. ↑ MDA.				Chen <i>et al.</i> 2000
Fer +/- phytase (colon de cochons).	↑ MDA. ↑ F2-isoprostanés. ↓ activité catalase.		Phytates.	Correction des effets pro-oxydants.	Porres <i>et al.</i> 1999
Fer +/- TNF α (cellules IEC-6).	↑ peroxydation lipidique. ↑ activité et expression MnSOD.				Kuratko <i>et al.</i> 1999
Fe ²⁺ -EDTA (intestin de rats).	↓ activité GST et LDH. ↓ [thiols]. ↑ [GSSG].				Mizoguchi <i>et al.</i> 1994
Fer (intestin de rats).	↑ peroxydation lipidique. ↑ activité CuZnSOD et Mn SOD. ↑ activité catalase. ↓ activité GSH-Px.				Srigirdhar <i>et al.</i> 1997
Fer-Ascorbate (microvillosités intestin de rats).	↑ peroxydation lipidique. ↓ activité phosphatase alcaline. ↓ fluidité membranaire.		Catalase, GSH, ou α -tocophérol.	Diminution des effets pro-oxydants.	Dudeja <i>et al.</i> 1993
Fer-Ascorbate (microvillosités intestin de cobaye).	↑ peroxydation lipidique. ↓ fluidité membranaire. ↓ transport glucose Na-dépendant.				Jourd'heuil <i>et al.</i> 1993
H ₂ O ₂ (cellules IEC-6).	↑ viabilité cellulaire (test MTT, ↑ libération de LDH). ↓ activité GST. ↓ activité thioredoxine reductase. ↑ activité et expression de thioredoxine (mécanisme de défense).				Higashikubo <i>et al.</i> 1999
H ₂ O ₂ (cellules Caco-2).	↑ cassures des brins d'ADN. ↑ oxydation des bases. ↓ viabilité cellulaire. ↓ croissance cellulaire.		Quercetine, myricetine.	Correction des effets pro-oxydants, sauf oxydation des bases.	Duthie <i>et al.</i> 1999

Tableau 2 : Effets des molécules pro-oxydantes et antioxydantes au niveau intestinal.

Pro-oxydants		Antioxydants		Références
Molécules	Effets	Molécules	Effets	
H ₂ O ₂ (colon de rats).	↑ [Ca ²⁺] _i . ↑ dommages ADN (tests COMET).	Butyrate, acétate.	↓ dommages ADN.	Abrahamse <i>et al.</i> 1999
H ₂ O ₂ (cellules Caco-2 et T84).	↑ perméabilité paracellulaire (résistance trans-épithéliale et [³ H]-mannitol). ↑ phosphorylation des tyrosines des protéines.			Rao <i>et al.</i> 1997
H ₂ O ₂ (colonocytes de rats).	↑ activité COX-2.			Karayalcin <i>et al.</i> 1990
H ₂ O ₂ ou Xanthine-Xanthine oxydase (cellules Caco-2).	↓ synthèse ADN.	Catalase, SOD, EGF.	Diminution des effets pro-oxydants.	Engler <i>et al.</i> 1999
H ₂ O ₂ ou Xanthine-Xanthine oxydase (cellules Caco-2).	↓ viabilité cellulaire. ↑ peroxydation lipidique.	(3,4-dihydroxyphényl)-ethanol.	Correction des effets pro-oxydants.	Manna <i>et al.</i> 1997
H ₂ O ₂ ou Xanthine-Xanthine oxydase (cellules HISM).	↑ perméabilité paracellulaire.	SOD, catalase.	Correction des effets pro-oxydants.	Bielefeldt <i>et al.</i> 1997
H ₂ O ₂ , ménadione, ou 2,3-diméthoxy-1,4-naphthoquinone (cellules Caco-2).	↑ [Ca ²⁺] libre intracellulaire. ↑ dommages sur l'ADN. ↑ activité PARP. ↑ [NAD ⁺]. ↓ [ATP]. ↓ viabilité cellulaire.			Karczewski <i>et al.</i> 1999
H ₂ O ₂ , HOCl, ou NO (cellules HCT116).	Inhibition GAPDH.	5-ASA.	Diminution des effets pro-oxydants.	McKenzie <i>et al.</i> 1999
Xanthine-Xanthine oxydase (mitochondries d'intestin de rats).	↑ perméabilité membranaire. ↑ influx de calcium. ↑ peroxydation lipidique. ↓ activité ATPase.	Spermine	Correction des effets pro-oxydants.	Anup <i>et al.</i> 1999
Ischémie reperfusion (intestin de rats).	↓ activité SOD. ↓ activité GSH-Px. ↑ activité CAT. ↑ MDA. ↑ altérations histologiques.	Vitamines C et E + allopurinol.	↓ uniquement le MDA et les altérations histologiques.	Kacmaz <i>et al.</i> 1999
Ischémie reperfusion (intestin de rats).	↑ MDA. ↓ infiltration PMN.	Acide Cafféique phenethyl ester.	Correction des effets pro-oxydants.	Kolukuz <i>et al.</i> 1999
Hypoxie réoxygénation (cellules Caco-2).	↑ production O ₂ • ↑ heat shock protein 70 (résultat du dommages aux protéines).			Gebhardt <i>et al.</i> 1999
Hypoxie réoxygénation (intestin de lapins).	↑ MDA. ↓ [GSH]. ↑ altérations histologiques.	Vitamine C, vitamine E ou mannitol.	Diminution des effets pro-oxydants (vitamine E moins efficace).	Gumel <i>et al.</i> 1998

Tableau 2 : Effets des molécules pro-oxydantes et antioxydantes au niveau intestinal.

Pro-oxydants		Antioxydants		Références
Molécules	Effets	Molécules	Effets	
Radiation ionisantes (intestin de rats).	<ul style="list-style-type: none"> ↑ peroxydes lipidiques. ↓ GSH. ↑ SOD. ↑ GSH-Px. ↓ GST. 	Sélénium et/ou vitamine E (pré-irradiation).	Correction des effets pro-oxydants.	Mutlu-Turkoglu <i>et al.</i> 2000
Iodoacetamide +/- fer (colon de rats).	<ul style="list-style-type: none"> ↑ MDA. ↑ modifications histologiques. (effets ↑ quand on ajoute du fer) 			Reifen <i>et al.</i> 2000
Ethanol (cellules Caco-2).	<ul style="list-style-type: none"> ↓ stabilité tubuline. ↑ oxydation & nitration tubuline. ↑ dommages microtubules. ↑ fluorescence dichlorofluoresceine. ↑ activité iNOS. Perturbation barrière intestinale. 	EGF & TGF α .	Correction des effets pro-oxydants.	Banan <i>et al.</i> 1999
Duodénum de patients souffrant de pancréatite chronique.	↑ MDA.			Ganesh Pai <i>et al.</i> 1999
LDL oxydées (cellules Caco-2).	<ul style="list-style-type: none"> ↑ dommages membranaires. ↑ modifications du cytosquelette. ↑ désorganisation microtubulaire. ↓ contacts cellules-cellules. ↑ décollement cellulaire. ↑ mort cellulaire. 	Tyrosol.	Correction des effets pro-oxydants.	Giovannini <i>et al.</i> 1999
Déficience en Zn (intestin de rats).	<ul style="list-style-type: none"> ↑ activité CuZnSOD. ↓ GSH-Px. ↓ catalase. ↑ peroxydation lipidique. 	Dexamethasone ou thyroxine.	Diminution des effets pro-oxydants.	Virgili <i>et al.</i> 1999
Dextran sodium sulfate (colon de rats).	<ul style="list-style-type: none"> ↑ 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. 			Tardieu <i>et al.</i> 1998
Acide trinitrobenzenesulfonique (colon de souris).	<ul style="list-style-type: none"> ↑ MDA. ↑ nitrotyrosines. ↑ érosion et ulcération colique. ↑ infiltration des neutrophiles. ↑ expression de ICAM-1 (dépendante de PARS). 			Zingarelli <i>et al.</i> 1999
7,12, dimethyl benzanthracene, dimethyl amino-methyl azobenzene et 3-methyl cholethrene (intestin de rats).	<ul style="list-style-type: none"> ↑ MDA. ↑ [GSH]. ↑ activité γ-GT & Na⁺ K⁺ ATPase. 	Piperine.	Correction des effets pro-oxydants.	Khajuria <i>et al.</i> 1998

Tableau 2 : Effets des molécules pro-oxydantes et antioxydantes au niveau intestinal.

Molécules	Pro-oxydants		Antioxydants		Références
	Effets	Molécules	Effets	Molécules	
LPS (intestin de rats).	↑ production de NO. ↓ [thiols]. ↑ peroxydation lipidique.	Inhibiteur de nitrique oxyde synthase.	Correction des effets pro-oxydants.	Chamulitrat <i>et al.</i> 1996a et b	
1,2-diméthylhydrazine (colon de rats).	↑ 8-hydroxy deoxyguanosine.	Extrait de thé vert.	Correction des effets pro-oxydants.	Inagake <i>et al.</i> 1995	
Perfusion de radicaux peroxy et hydroxyl (fœtus de rats).	↑ dommages sur la muqueuse.	Solution aqueuse de pectine.	Correction des effets pro-oxydants.	Kohen <i>et al.</i> 1993	
S-nitroso-N-acétylpenicillamine (donneur NO•) ou 3-morpholino sydnonimine (donneur peroxy nitrite) (cellules Caco-2).	↑ perméabilité paracellulaire. ↓ [GSH]. ↓ groupements sulfhydryls des protéines.	2-(4-carboxyphényl)-4,5,5-tetraméthylimidazole-1-oxy-1,3-oxide (scavenger NO•) & Tiron (scavenger O ₂ •).	Diminution des effets sur la perméabilité paracellulaire.	Menconi <i>et al.</i> 1998	
Peptides dérivés gliadine (cellules Caco-2).	↓ prolifération cellulaire. ↑ [peroxydes lipidiques]. ↑ ratio [GSSG]/[GSH]. ↓ groupements sulfhydryls des protéines.	Deferoxamine, urate ou GSH (scavenger peroxy nitrite).		Rivabene <i>et al.</i> 1999	
Stress, alimentation riche en huile, épices ou éthanol (estomac et intestin rats).	↑ production O ₂ • et OH•. ↑ peroxydation lipidique. ↑ dommages sur l'ADN.	Bismuth subsalicylate.	Diminution des effets pro-oxydants.	Bagchi <i>et al.</i> 1998	
Ménadione, t-butyl hydroperoxyde, acide aminé oxydase, xanthine-xanthine oxydase (cellules Caco-2).	↑ perméabilité paracellulaire. ↓ viabilité cellulaire. ↓ [ATP]. ↑ [GSSG]. ↑ activité shunt hexose monophosphate.	SOD, catalase, mannitol, BHT.	Diminution des effets pro-oxydants (sauf avec SOD).	Baker <i>et al.</i> 1995 & 1993	
Peroxydes lipidiques (cellules Caco-2).	↓ viabilité cellulaire. ↓ [GSH].			Cepinskas <i>et al.</i> 1994	
		d-Limonene, β-carotène, oltipraz, coumarin ou α-tocopherol (colon de rats).	↑ activité GSH-Px.	van Lieshout <i>et al.</i> 1998	

Tableau 2 : Effets des molécules pro-oxydantes et antioxydantes au niveau intestinal.

Ainsi, les bactéries pathogènes présentes dans la lumière de l'intestin attirent les cellules phagocytaires ; le rôle de ces dernières étant de détruire ces agents étrangers par l'intervention d'espèces réactives, d'hydrolases, de protéases et de phosphatases. Il faut savoir que les bactéries peuvent également engendrer un stress oxydant au niveau des cellules intestinales par une autre voie, indépendante des cellules phagocytaires (et donc qui pourrait s'y ajouter). En effet, il a déjà été démontré que les lipopolysaccharides (endotoxines présentes dans la paroi cellulaire des bactéries -Olaya *et al.* 1999-) induisent une augmentation de l'expression protéique et de l'activité de l'enzyme oxyde nitrique synthétase inductive (iNOS) (Brown *et al.* 1997, Chalumitrat *et al.* 1996a et b, Mercer *et al.* 1996). La production d'oxyde nitrique est alors augmentée, ainsi que celle de l'anion superoxyde (Martinez *et al.* 2000). Ce premier peut réagir avec l'anion superoxyde pour former le peroxyde nitrique, qui sous forme protonée, peut facilement libérer un radical hydroxyl (Brown *et al.* 1997, Chalumitrat *et al.* 1996a et b, Mercer *et al.* 1996). Une augmentation de la peroxydation lipidique est d'ailleurs observée suite à l'exposition de cellules intestinales aux lipopolysaccharides (Brown *et al.* 1997, Chalumitrat *et al.* 1996a et b, Mercer *et al.* 1996). Il est intéressant de noter que des inhibiteurs de l'iNOS inhibent la formation du radical hydroxyl induite par les lipopolysaccharides, confirmant l'implication de cette enzyme dans ce phénomène (Chalumitrat *et al.* 1996a et b). Les lipopolysaccharides peuvent augmenter l'expression protéique et l'activité de l'enzyme cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses de l'intestin (Longo *et al.* 1998a et b). Cyclooxygénase (ou prostaglandine H synthétase) est l'enzyme clé qui catalyse les deux premières étapes de la biosynthèse des prostaglandines à partir d'acides gras polyinsaturés (comme l'acide arachidonique, l'acide dihomog- γ -linoléique et l'acide eicosapentaénoïque) (Marnett *et al.* 1999, Vane *et al.* 1998) (annexe 12). Lors de ces réactions, l'acide gras polyinsaturé est oxydé en endoperoxyde. On peut d'ailleurs noter une augmentation de la peroxydation lipidique lors de cette réaction, car il y a formation de radicaux libres (Marks *et al.* 2000). Deux isoformes de l'enzyme existent : cyclooxygénase-1 ou COX-1 et cyclooxygénase-2 ou COX-2 (Dubois *et al.* 1998). COX-1 est exprimée dans l'intestin sain et son niveau ne change pas dans les tumeurs intestinales (c'est la forme constitutive) ; alors que COX-2 est indétectable dans

l'intestin sain, mais son expression augmente dans les tumeurs et les inflammations intestinales (c'est la forme inductive) (Kargman *et al.* 1995 & 1996, Eberhart *et al.* 1994, Sano *et al.* 1995, Dubois *et al.* 1998, Marks *et al.* 2000). COX-1 synthétise des prostaglandines impliquées dans la régulation normale de l'activité cellulaire, alors que COX-2 produit des prostaglandines pro-inflammatoires, essentiellement au niveau du site de l'inflammation (Dubois *et al.* 1998, Geis 1999). Pourquoi les lipopolysaccharides augmentent l'expression protéique et l'activité de COX-2 ? L'explication de ce phénomène repose sur le fait que le peroxy-nitrite active COX-2 (Martinez *et al.* 2000, Salvemini *et al.* 1995). Or nous venons de voir que les lipopolysaccharides favorisent la production de peroxy-nitrite par activation de l'iNOS. D'ailleurs, la présence de superoxyde dismutase ou d'un inhibiteur de l'iNOS réduit la biosynthèse de prostaglandines en présence de lipopolysaccharides (Salvemini *et al.* 1995). Il est intéressant de noter que le peroxyde d'hydrogène est capable d'augmenter l'activité de COX-2 au niveau des colonocytes (Karayalcin *et al.* 1990), ce qui démontre encore une fois que cette enzyme est sensible à l'intervention de molécules pro-oxydantes.

Il existe un autre cas où l'on peut noter un stress oxydant élevé ; il s'agit de l'ischémie-reperfusion de l'intestin (tableau 2) (Gebhardt *et al.* 1999, Gunel *et al.* 1998, Kacmaz *et al.* 1999, Koltuksuz *et al.* 1999, Kehrer 1993). Suite à une période où l'oxygène ne peut être distribué à l'intestin, un réapprovisionnement en oxygène provoque une explosion d'espèces réactives, qui pourraient jouer un rôle dans la destruction des cellules atteintes de manière irréversible par l'hypoxie (Kehrer 1993). Il a été observé que la xanthine oxydase est la source majeure d'espèces réactives de l'oxygène pendant la reperfusion de l'intestin ischémique (Granger *et al.* 1981, Parks *et al.* 1982). Suite à cette reperfusion, on note une augmentation de l'infiltration des granulocytes au niveau de l'intestin ; fait intéressant, l'allopurinol, inhibiteur de la xanthine oxydase, prévient cette infiltration (Grisham *et al.* 1986). La catalase ou le diméthylthiourée atténuent également l'infiltration. La xanthine oxydase, par ses effets pro-oxydants, favorise donc l'arrivée des granulocytes vers le lieu atteint par l'ischémie-reperfusion. Il faut savoir aussi que le simple fait de faire une laparotomie, puis de bouger légèrement l'intestin augmente les niveaux de xanthine oxydase et diminue

l'activité de la catalase, provoquant ainsi des dommages au niveau de l'intestin durant la première heure après la laparotomie (Anup *et al.* 1999).

5.2. Effets du stress oxydant sur les fonctions de l'intestin :

5.2.1. Effets sur la fonction de barrière sélective :

L'une des fonctions primordiales de l'intestin est d'assurer le rôle de barrière sélective entre le milieu extérieur et la circulation systémique et d'éviter ainsi aux molécules ou organismes indésirables (comme les bactéries par exemple) de pénétrer dans l'organisme. Quelques études ont démontré que la perméabilité intestinale était affectée par les espèces réactives. C'est le cas du NO• et du peroxyde d'azote (Menconi *et al.* 1998), de la ménadione, du *tert*-butyl hydroperoxyde, des oxydases (Baker *et al.* 1995, Manna *et al.* 1997), du peroxyde d'hydrogène (Rao *et al.* 1997) et de l'acide lactique (Gonzalez *et al.* 1997) qui perturbent la perméabilité paracellulaire. Les effets de ces molécules sont bien reliés à leurs actions pro-oxydantes, car l'ajout d'antioxydants exogènes ou endogènes permet de réduire ou d'inhiber l'augmentation de la perméabilité paracellulaire (Baker *et al.* 1995, Manna *et al.* 1997, Menconi *et al.* 1998, Rao *et al.* 1997). Les jonctions serrées liant les cellules épithéliales intestinales entre elles, constituent la cible des espèces réactives, créant ainsi un passage entre les entérocytes pour des molécules qui ne devraient théoriquement pas pénétrer dans la circulation systémique (Rao *et al.* 1997). La phosphorylation des résidus tyrosines semble être un facteur important dans l'augmentation de la perméabilité paracellulaire induite par les espèces réactives comme le peroxyde d'hydrogène (Rao *et al.* 1997).

Dans le cas particulier de l'ischémie-reperfusion, il a également été observé une augmentation de la perméabilité de l'endothélium et de la muqueuse intestinale lors de la production d'espèces réactives, facilitant ainsi la pénétration des leucocytes (van der Vliet *et al.* 1992). A leur tour, les leucocytes pro-inflammatoires vont produire des

espèces réactives de l'oxygène, ce qui va favoriser le développement des dommages tissulaires (Baker *et al.* 1991, van der Vliet *et al.* 1992).

Ainsi, si la perméabilité paracellulaire est perturbée, le rôle de barrière intestinale est moins bien assuré. On peut aisément penser que les bactéries présentes dans la lumière du tube digestif peuvent alors pénétrer entre les cellules épithéliales, et provoquer une réaction inflammatoire au sein même de la muqueuse intestinale. Cela a été démontré. En effet, suite à un stress chirurgical, les niveaux de xanthine oxydase augmentent et l'activité de la catalase diminue (Anup *et al.* 1999, Carrico *et al.* 1986) et en parallèle, une augmentation de la perméabilité intestinale est observée. En conséquence, on peut noter une augmentation de la translocation des bactéries de la lumière du tube digestif vers la circulation systémique (Carrico *et al.* 1986). Cela a également été démontré dans des modèles d'ischémies (Sun *et al.* 2000, Tadros *et al.* 2000).

5.2.2. Effets sur la viabilité cellulaire des cellules intestinales :

L'un des premiers effets qui a été observé au niveau cellulaire, suite à un stress oxydant est la diminution du nombre de cellules viables. Il existe plusieurs tests de viabilité cellulaire : test au bleu trypan, mesure de la lactate deshydrogénase, test du MTT, ... Il a été démontré que des espèces réactives comme le peroxyde d'hydrogène ou l'anion superoxyde (Baker *et al.* 1993 et 1995, Duthie *et al.* 1999, Higashikubo *et al.* 1999, Karczewski *et al.* 1999, Manna *et al.* 1997) peuvent diminuer la viabilité cellulaire au niveau intestinal, suivant les doses administrées. Deux schémas existent : s'il s'agit d'un stress oxydant faible à moyen, les cellules entrent en état d'apoptose ; par contre, s'il s'agit d'un violent stress oxydant, les cellules entrent en nécrose (Aw 1999, Baker *et al.* 1993 et 1995, Duthie *et al.* 1999, Higashikubo *et al.* 1999, Karczewski *et al.* 1999, Manna *et al.* 1997).

5.2.3. Effets sur les propriétés physiques de la bordure en brosse des cellules épithéliales :

Les espèces réactives de l'oxygène contribuent à la peroxydation des membranes cellulaires, et à l'augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale, augmentant ainsi la translocation bactérienne et l'arrivée des phagocytes pour détruire les bactéries (Bagchi *et al.* 1999, Horton *et al.* 1993). L'oxydation de la bordure en brosse par le générateur de radicaux peroxylys (acide 2,2'-azobis-(2-amidinopropane)hydrochlorique) montre que la somme des antioxydants disponibles est consommée plus rapidement dans le feuillet externe de cette membrane, rendant ainsi ce feuillet plus sensible à la peroxydation lipidique que le feuillet interne (Jourd'heuil *et al.* 1995). Par contre, le feuillet interne de la bordure en brosse contient plus d'acides gras polyinsaturés que le feuillet externe, ce qui pourrait le rendre lui aussi plus sensible à la peroxydation (Devaux 1991). Quoiqu'il en soit, la bordure en brosse en totalité peut être atteinte par le stress oxydant. En effet, dans un modèle *in vitro*, les attaques peroxydatives sur les bordures en brosse isolées d'intestin de cobaye altèrent leurs propriétés physiques diminuant ainsi la fluidité membranaire (Jourd'heuil *et al.* 1993).

5.2.4. Effets sur les enzymes de la bordure en brosse des cellules épithéliales :

Plusieurs enzymes peuvent être affectées par les espèces réactives présentes dans l'intestin. En effet, l'une des premières enzymes à rencontrer ces espèces réactives est la phosphatase alcaline de la bordure en brosse. Il a été démontré que l'activité de cette enzyme est diminuée suite à son exposition à des générateurs de radicaux libres (Coleman 1992, Dudeja *et al.* 1993, Sisley *et al.* 1999). Contrairement aux autres enzymes de la bordure en brosse, la phosphatase alcaline possède des sites de liaison pour les métaux près de son site actif, la rendant ainsi plus susceptible à l'oxydation par les métaux (Coleman 1992). Cela explique certainement pourquoi les autres enzymes de

la bordure en brosse, comme la sucrase isomaltase, la leucine aminopeptidase et la γ -glutamyl transpeptidase, ne sont pas sensibles au stress oxydant (Dudeja *et al.* 1993).

L'ajout d'antioxydants, comme la catalase ou l' α -tocopherol, permettent de protéger l'activité de la phosphatase alcaline (Dudeja *et al.* 1993). En outre, même si l'on corrige la diminution de la fluidité membranaire causée par le stress oxydant avec un fluidifiant, l'enzyme ne retrouve pas totalement son activité normale (Dudeja *et al.* 1993). Ainsi, dans la cas de la phosphatase alcaline, son inactivation par les espèces réactives semble être due principalement à une atteinte directe de l'enzyme au niveau de son site catalytique.

5.2.5. Effets sur les autres enzymes des cellules épithéliales :

Le stress oxydant induit par l'ischémie-reperfusion, augmente les niveaux de peroxyde d'hydrogène qui est responsable de la libération de 6-ceto-PGF1 alpha et de TXB2, favorisant ainsi l'inflammation (Murthy *et al.* 1990). Ce phénomène fait intervenir la phospholipase A2, car l'inhibition de cette dernière bloque la libération de 6-ceto-PGF1 alpha. Nous avons vu que COX-2 est responsable de la synthèse de prostaglandines pro-inflammatoires. Karayalcin *et al.* (1990) ont démontré que le peroxyde d'hydrogène est capable d'augmenter l'activité de COX-2 au niveau des colonocytes, ce qui démontre encore que des espèces réactives peuvent activer les facteurs proinflammatoires au niveau intestinal.

En outre, il a été démontré que le stress oxydant active la phospholipase D mitochondriale qui, en conséquence, altère la composition lipidique des membranes mitochondriales (Madesh *et al.* 1997 a et b). L'oxyde nitrique ou la SOD peuvent inhiber la phospholipase D, prévenant ainsi les altérations lipidiques des membranes mitochondriales (Madesh *et al.* 1997 a et b).

Certaines enzymes mitochondriales peuvent être affectées par le stress oxydant induit par du glutathion réduit. C'est le cas de la succinic dehydrogenase, de l'isocitrate

dehydrogenase, de la total ATPase et de la NADH dehydrogenase alors que la NADH oxydase n'est pas affectée (Benard *et al.* 1995).

L'enzyme nucléaire poly(ADP-ribose) polymérase est impliquée dans les modifications post traductionnelles des protéines et des enzymes nucléaires (Realini *et al.* 1992) (annexe 13). C'est le cas des protéines histones qui, ainsi ribosilées, facilitent l'accès des enzymes de réparation de l'ADN endommagé (Realini *et al.* 1992). La poly(ADP-ribose) polymérase induit une diminution du NAD^+ intracellulaire, et ainsi perturbe la synthèse d'ATP (Karczewski *et al.* 1999). Cela a pour conséquence d'amener la cellule vers une mort cellulaire par nécrose (Sims *et al.* 1983). Ce suicide en guise de réponse à un stress oxydant permet à des mutations indésirables de ne pas apparaître, mais cela favorise l'aggravation des maladies inflammatoires. L'inhibition de la poly(ADP-ribose) polymérase prévient la déplétion du NAD^+ dans les cellules Caco-2 soumises à un stress oxydant ; les niveaux d'ATP et la viabilité cellulaire sont ainsi moins affectés (Karczewski *et al.* 1999). La chélation du calcium permet de prévenir les effets de la poly(ADP-ribose) polymérase, démontrant ainsi que le calcium est impliqué dans la mort cellulaire induite par cette enzyme affectée (Karczewski *et al.* 1999).

L'enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (enzyme impliquée dans la glycolyse) peut être la cible du stress oxydant au niveau intestinal (McKenzie *et al.* 1999). En effet, elle possède une cystéine réduite dans son site actif, ce qui lui confère sa sensibilité au stress oxydant (McKenzie *et al.* 1996). Les conséquences de ce phénomène pourraient amener la cellule intestinale à moins pouvoir utiliser le glucose comme source d'énergie.

5.2.6. Effets sur le métabolisme des cellules épithéliales :

Outre les dommages sur les constituants cellulaires, les espèces réactives peuvent avoir des effets sur l'équilibre fonctionnel de la cellule. Ainsi, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyl et les peroxydes lipidiques sont maintenant connus pour agir sur les mécanismes de signalisation intracellulaire (Suzuki *et al.* 1997). Cette dernière est impliquée normalement dans le passage de l'information provenant de

l'extérieur de la cellule vers l'intérieur de la cellule elle-même. Le "messenger" de l'information peut être une hormone, un facteur de croissance, une cytokine, ou un neurotransmetteur qui va moduler le fonctionnement de la cellule au niveau entre autre transcriptionnel, traductionnel, ou encore au niveau des éléments contractiles. Dans ce processus interviennent des récepteurs, des effecteurs, des seconds messagers, des protéines kinases et des phosphoprotéines (Suzuki *et al.* 1997). L'état de phosphorylation des protéines est dans la plupart des cas le composant le plus important de la signalisation intracellulaire. Les scientifiques ont commencé à s'intéresser au rapport entre le stress oxydant et la signalisation intracellulaire à partir du moment où ils ont découvert que l'oxyde nitrique (NO, espèce réactive synthétisée par l'oxyde nitrique synthétase à partir de L-arginine) agissait comme second messenger dans des processus biologiques important comme la relaxation des muscles lisses, la neurotransmission, et la régulation immunitaire (Lowenstein *et al.* 1992).

Le calcium est un second messenger impliqué dans de nombreux processus biologiques (contraction musculaire, neurotransmission, transcription de gènes et croissance cellulaire) (Suzuki *et al.* 1997). Il a été montré que les espèces réactives de l'oxygène peuvent augmenter la concentration de calcium cytosolique, celui-ci pouvant alors enclencher la signalisation dépendante du calcium (Bielefeldt *et al.* 1997, Suzuki *et al.* 1997). Le calcium cytosolique peut avoir différentes origines. Il peut provenir du réticulum sarcoplasmique, de l'espace extracellulaire, des mitochondries, et des protéines liant le calcium (annexe 14). Les espèces réactives de l'oxygène peuvent également augmenter les niveaux de calcium cytosolique en favorisant la pénétration du calcium extracellulaire dans la cellule (Bielefeldt *et al.* 1997, Suzuki *et al.* 1997). L'explication réside dans le fait que le fonctionnement des transporteurs calciques associés à la membrane plasmique sont modifiés (Bielefeldt *et al.* 1997, Suzuki *et al.* 1997). Les mitochondries représentent un pool de calcium intracellulaire important ; le *tert*-butyl hydroperoxyde est capable de provoquer la libération de calcium de ces organelles par un processus dépendant de l'oxydation du NAD(P)H puis de l'hydrolyse du NAD(P)⁺ (Lotscher *et al.* 1979). Ces effets peuvent être inversés par l'ajout d'agents réduisant le NAD(P)⁺ (Moore *et al.* 1983). Récemment, le rôle des protéines liant le calcium a été

reconnu comme une source du calcium cytosolique élevée suite au stress oxydant (Suzuki *et al.* 1997).

La phosphorylation des protéines joue également un rôle très important dans la signalisation intracellulaire. Ces protéines peuvent être des enzymes, des récepteurs, des facteurs de transcription et des éléments contractiles qui peuvent ainsi être activés ou inactivés par l'état de phosphorylation de leurs résidus acides aminés (Suzuki *et al.* 1997). Deux classes d'enzymes sont impliquées dans ce phénomène : les protéines kinases (qui sont responsables de la phosphorylation) et les protéines phosphatases (qui retirent le phosphate de la protéine). Elles sont spécifiques de certains acides aminés ; il s'agit des résidus serine/thréonine et des résidus tyrosine (Suzuki *et al.* 1997). L'activation de la phosphorylation par le stress oxydant peut provenir soit de l'activation des protéines kinases soit de l'inactivation des protéines phosphatases. Mais d'une manière similaire, le stress oxydant peut également activer les protéines phosphatases et inactiver les protéines kinases (Suzuki *et al.* 1997). La stimulation de l'activité de la tyrosine kinase et ainsi l'augmentation de la phosphorylation des résidus tyrosines ont été démontrées suite à un stress oxydant (Zick *et al.* 1990). Ces mêmes effets peuvent également être dus à une inactivation de la tyrosine phosphatase (Garcia-Morales *et al.* 1990, Hadari *et al.* 1993, Sullivan *et al.* 1994). Les tyrosine phosphatases ont des résidus cystéines au niveau de leur site actif (Fischer *et al.* 1991) ; l'atteinte de ces derniers par le stress oxydant pourrait expliquer cette inhibition. La phosphorylation des résidus serine/thréonine a également été observée suite à un stress oxydant (Suzuki *et al.* 1997). En effet, un stress oxydant induit par certaines quinones est capable d'activer l'activité de la protéine kinase C cytosolique (Kass *et al.* 1989). Le β -mercaptoéthanol, le dithiothreitol, ou le glutathion peuvent inhiber l'activation de la protéine kinase C cytosolique induite par les quinones. Fait intéressant, l'ajout de glutathion oxydé (GSSG), même en présence de glutathion réduit (GSH), augmente l'activité de la protéine kinase C cytosolique (Kass *et al.* 1989). L'explication de ce phénomène pourrait être que la protéine kinase C cytosolique possède un contrôle dépendant de l'état redox, et qu'ainsi toute molécule jouant sur cet équilibre pourrait moduler l'activité de cette enzyme (Suzuki *et al.* 1997). Les réactions d'oxydation influencent ainsi la liaison avec certains effecteurs, comme le diacylglycerol, mais facilitent aussi l'activité catalytique

indépendante du calcium et des phospholipides (Suzuki *et al.* 1997). Une autre explication pourrait être basée sur l'inhibition des protéines phosphatases 1 et 2A. Il a été montré que l'oxydation des thiols présents dans ces phosphatases inhibe ces dernières (Nemani *et al.* 1993).

Ainsi, pour résumer, le stress oxydant, peut agir sur les niveaux de calcium cytosolique, soit directement, soit indirectement par l'intermédiaire des IP₃. De la même manière, la stimulation de la protéine kinase C peut avoir une origine directe du stress oxydant ou indirecte par intervention du calcium ou de la protéine G et du diacylglycerol.

Il apparaît donc que le stress oxydant peut activer certaines voies de signalisation intracellulaire. Quels sont les effets connus de cette activation? Le stress oxydant peut agir sur certains facteurs de transcription. En effet, il a été démontré que le peroxyde d'hydrogène pouvait induire l'activation du facteur de transcription AP-1 (activator protein-1) par phosphorylation de ses résidus tyrosine et serine/thréonine (Barchowsky *et al.* 1995, Jourd'heuil *et al.* 1997 a). AP-1, hétérodimère des protéines Fos et Jun, contrôle l'expression de médiateurs de croissance cellulaire (Rivera *et al.* 1990). Cela est également le cas du facteur de transcription NF- κ B qui est activé par dissociation de la sous-unité I κ B α du dimère p65/p50 (Aw 1999, Baeuerle 1991, Jourd'heuil *et al.* 1997 b, Schreck R *et al.* 1991). Ainsi activé, il peut migrer vers le noyau pour se lier à l'ADN. En conséquence, les gènes pro-inflammatoires seront activés par NF-kappa B (comme des molécules d'adhésion, des cytokines et d'autres enzymes) (Jourd'heuil *et al.* 1997 a). Il est intéressant de noter que les lipopolysaccharides activent le facteur de transcription NF- κ B ; l'ajout d'un antioxydant (pyrrolidine dithiocarbamate) bloquent l'effet des lipopolysaccharides sur NF- κ B (Schreck R *et al.* 1992).

Le stress oxydant peut également être considéré comme second messenger de certains ligands comme le tumor necrosis factor α (TNF α), l'interleukine 1 β (IL 1 β), le transforming growth factor β 1 (TGF β 1), le platelet derived growth factor (PDGF), l'insuline, l'angiotensine II, la vitamine D3 et l'hormone parathyroïde (Suzuki *et al.* 1997). Le TNF α est connu pour produire un stress oxydant pouvant être impliqué dans l'activation des facteurs de transcription comme AP-1 et NF- κ B, mais aussi dans

l'apoptose (mort cellulaire programmée) (Suzuki *et al.* 1997). Matthews *et al.* (1987) ont démontré une augmentation de la peroxydation lipidique en réponse au traitement avec le TNF α . L'augmentation des niveaux de glutathion oxydé (GSSG) ainsi que de la production de dommages sur l'ADN ont été observés (Zimmerman *et al.* 1989a). Il a également été démontré que la cytolyse induite par le TNF α pouvait être inhibée par des antioxydants de faible poids moléculaire (prométhazine, desferal, et l'hydroxytoluène butylé -BHT-) (Matthews *et al.* 1987), mais aussi par des scavengers du radical hydroxyl (diméthyl sulfoxyde -DMSO-) et par des chélateurs de fer (bipyridine) (Yamauchi *et al.* 1989). En outre, le prétraitement avec un inhibiteur de la synthèse de GSH (DL-buthionine-sulfoxamine) augmente la sensibilité de la cellule à la toxicité du TNF α , alors qu'un prétraitement avec le *N*-acétylcystéine réduit cette toxicité (Zimmerman *et al.* 1989b). D'autres molécules comme l'interleukine 1 et l'interféron- γ provoquent une augmentation des niveaux d'anion superoxyde (Matsubara *et al.* 1986).

Ainsi les molécules intervenant dans les mécanismes de l'inflammation provoquent la production de molécules pro-oxydantes qui seront utilisées comme second messagers dans la transmission de l'information. Il apparaît donc logique que la production de molécules pro-oxydantes, sans l'intervention de molécules pro-inflammatoires, puisse engendrer les mêmes effets sur la signalisation intracellulaire. Il a d'ailleurs été démontré que l'apoptose pouvait être induite par le peroxyde d'hydrogène ou la ménadione (Hockenbery *et al.* 1993), mais aussi que cette première pouvait être inhibée par l'ajout d'antioxydants (*N*-acétylcystéine, catalase, vitamine E, ou β -mercaptoéthanol) (Malorni *et al.* 1993, Sandstrom *et al.* 1993). Une ischémie-reperfusion de l'intestin peut provoquer l'entrée des entérocytes dans un état d'apoptose (Noda *et al.* 1998). Il a d'ailleurs été observé une diminution de la synthèse d'ADN dans les cellules Caco-2 suite à un traitement avec le peroxyde d'hydrogène ou le système xanthine oxydase/xanthine (Engler *et al.* 1999). La maladie cœliaque est un désordre inflammatoire dans la partie supérieure de l'intestin grêle dans laquelle le gluten est un facteur essentiel dans la pathogenèse. En utilisant le modèle Caco-2, il a été démontré que les peptides dérivés de la gliadine ont un effet antiprolifératif associé à une augmentation des peroxydes lipidiques, une augmentation du ratio GSSG/GSH et une perte des groupements sulfhydryls (Rivabene *et al.* 1999). Cependant, l'intestin peut

entrer en état de nécrose si les dommages induits par le stress oxydant et l'inflammation sont trop importants (Caddell 1996).

Bcl-2 est connu pour inhiber l'apoptose en régulant les voies antioxydantes (Hockenbery *et al.* 1993). Il a également été démontré que les pro-oxydants pouvaient augmenter l'activité de liaison à l'ADN de p53, ce dernier étant impliqué dans l'apoptose (Lowe *et al.* 1993).

Il apparaît donc qu'à l'image classique des molécules pro-oxydantes en tant que molécules destructrices des composants biologiques s'ajoute celle de molécules régulatrices de fonctions biologiques. La stimulation des niveaux de calcium cytosolique et la phosphorylation des protéines peut expliquer en partie ce phénomène. Suzuki *et al.* (1997) émettent même l'idée que l'induction de l'expression des gènes des enzymes antioxydantes pourrait faire intervenir des voies de signalisation intracellulaire dépendante du calcium et de la phosphorylation des protéines.

5.2.7. Effets sur l'absorption des nutriments :

Les entérocytes étant affectés par le stress oxydant peuvent-ils être perturbés au point de ne plus pouvoir assurer parfaitement la fonction de transporteur de nutriments alimentaires ? Peu d'études existent à ce sujet.

L'hypoxie chronique (10 % d'oxygène pendant 10 jours) augmente les niveaux de peroxydation lipidique, mais surtout diminue la capacité de l'intestin à utiliser le glucose (LeGrand *et al.* 1998). En outre, les attaques peroxydatives sur les bordures en brosse isolées d'intestin de cobaye diminuent le transport du glucose dépendant du sodium (Jourd'heuil *et al.* 1993). Plusieurs facteurs seraient impliqués dans ce phénomène ; un tiers de cette réduction est dû à l'augmentation de la rigidité de la bordure en brosse et est réversible dans le sens où des fluidifiants membranaires restaurent ce tiers de réduction (Jourd'heuil *et al.* 1993). Les deux tiers restants sont indépendants des propriétés physiques de la bordure en brosse, et seraient dus aux dommages directs portés sur la protéine transporteuse du glucose (Jourd'heuil *et al.* 1993).

La diminution du GSH intracellulaire diminue la capacité des entérocytes à éliminer les peroxydes lipidiques présents dans la lumière de l'intestin ; ces derniers se retrouvent ainsi plus facilement dans la lymphe en comparaison avec le témoin qui a des niveaux de GSH normaux (Aw *et al.* 1992 a et b). Le glutathion exogène, qu'il soit d'origine biliaire ou alimentaire, augmente les niveaux de glutathion dans la cellule intestinale, favorisant ainsi la capacité d'élimination des peroxydes lipidiques (Aw 1994). En outre, les lipides oxydés dans la lumière de l'intestin sont absorbés par l'intestin grêle et incorporés dans les chylomicrons (Staprans *et al.* 1994). Ainsi, les graisses alimentaires oxydées entrent dans la circulation via les chylomicrons. Cependant, un faible pourcentage des peroxydes lipidiques alimentaires se retrouve dans les chylomicrons comparé aux lipides natifs (Staprans *et al.* 1994). Cela explique peut être pourquoi l'acide 13-hydroxy octadecadiénoïque (13-HODE), un acide gras oxydé, diminue la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides du côté basolatéral (diminution de la sécrétion des triglycérides et de l'apo B) (Murthy *et al.* 1998).

Le transport des acides aminés à travers la bordure en brosse peut également être touché. En effet, un stress oxydant induit par *Salmonella typhimurium* diminue ce transport, menant ainsi à la diminution de la synthèse protéique dans les entérocytes (Mehta *et al.* 1999).

De surcroît, une diminution de la motilité intestinale a été observée (diminution de la fréquence des contractions spontanées et des périodes de repos), ce qui peut perturber l'absorption des nutriments par l'intestin (Bielefeldt *et al.* 1997).

Les espèces réactives de l'oxygène peuvent augmenter la sécrétion des électrolytes et de l'eau par la muqueuse intestinale, favorisant ainsi l'apparition des diarrhées (Nalini *et al.* 1993). Cela pourrait peut être expliquer les nombreuses diarrhées observées dans les cas de maladies inflammatoires de l'intestin.

5.3. Les antioxydants des cellules épithéliales :

5.3.1. Les antioxydants endogènes :

Les enzymes antioxydantes présentes dans les cellules de l'intestin peuvent être affectées par le stress oxydant. En effet, une diète élevée en fer provoque une élévation des niveaux de substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARS ; indice de peroxydation lipidique) avec une augmentation en parallèle de l'activité de la Cu-Zn-SOD et de la Mn-SOD, de la catalase ; par contre, une diminution de l'activité de la glutathion peroxydase a pu être observée (Kuratko 1999, Srigiridhar *et al.* 1997). En outre, une hypoxie (10 % d'oxygène) pendant plusieurs jours, diminue l'activité de la glutathion peroxydase, de la glutathion disulfide reductase, et de la gamma-glutamyl cysteine synthétase (LeGrand *et al.* 1996). Cela réduit ainsi la capacité de détoxification des peroxydes (LeGrand *et al.* 1997). L'état de différenciation des cellules intestinales est également un facteur important, car la différenciation des cellules permet d'accroître la capacité de résistance au stress oxydant, dans le sens où plus une cellule est différenciée, plus elle aura développé ses "armes" antioxydantes. Il s'agit du glutathion (Cepinskas *et al.* 1994, Duthie *et al.* 1997), de la SOD, de la glutathion peroxydase, de la glutathion disulfide reductase, de la glutathion-S-transferase et la catalase (Baker *et al.* 1992, Duthie *et al.* 1997, Vecchini *et al.* 1997). Par contre, les niveaux de bcl-2 (protéines antioxydantes, également anti-apoptotique) sont diminués au cours de la différenciation cellulaire (Vecchini *et al.* 1997).

Le long de l'axe proximo-distal du tube digestif, l'expression des enzymes antioxydantes n'est pas la même. Ainsi, il a été observé que le colon et l'estomac présentent des niveaux de glutathion et de SOD supérieurs à ceux de l'intestin grêle (van der Vliet *et al.* 1989). De même, la muqueuse de l'intestin grêle possède moins de glutathion peroxydase et de catalase que les muscles lisses ; par contre, dans le colon, les deux enzymes sont distribuées de manière équivalente dans la muqueuse et dans les muscles lisses (van der Vliet *et al.* 1989). Enfin, la xanthine oxydase est principalement présente au niveau de la muqueuse de l'intestin grêle (van der Vliet *et al.* 1989). Il

semble donc que l'intestin grêle soit plus apte à être sensible au stress oxydant que l'estomac ou le colon. Cependant, le colon est paradoxalement plus sensible au peroxyde d'hydrogène que l'intestin grêle (van der Vliet *et al.* 1989). Une étude plus récente a démontré que le pouvoir réducteur (activité antioxydante totale) est plus élevé dans la muqueuse de l'intestin grêle que dans celle du colon (Blau *et al.* 1999). Cela pourrait donc expliquer pourquoi van der Vliet *et al.* ont trouvé que le colon est plus sensible au peroxyde d'hydrogène que l'intestin grêle. Blau *et al.* (1999) ont pris en compte également les antioxydants de faible poids moléculaires qui sont importants dans la lutte contre le stress oxydant.

L'insuline peut avoir un effet sur les activités de la glutathion peroxydase, de la glutathion disulfide reductase et de la glucose-6-phosphate dehydrogénase (permet la production de NADPH), car après une injection d'insuline sur des rats diabétiques insulino-dépendants, les activités de ces enzymes sont diminuées au niveau de l'intestin (Iwakiri *et al.* 1995). Par contre, fait intéressant, l'ajout de glucose dans la lumière intestinale améliore la capacité de détoxification des hydroperoxydes en augmentant la quantité de NADPH par la voie des pentoses phosphates (Aw *et al.* 1994). Le diabète est connu pour induire la formation d'espèces réactives, et ainsi favoriser le stress oxydant (Kakkar *et al.* 1995). Ainsi, dans le cas d'un diabète induit par la streptozotocine, l'activité de la glutathion-S-transferase est augmentée dans le jéjunum et l'iléon (Giron *et al.* 1999). Plus précisément, les formes α et μ sont surexprimées au niveau du jéjunum, alors que les formes α , π et μ sont surexprimées au niveau de l'iléon suite au diabète (Giron *et al.* 1999). L'activité de la catalase, quant à elle, ne varie pas dans l'intestin des rat diabétiques (Giron *et al.* 1999).

La cellule intestinale peut avoir des systèmes de défenses qui ne se trouvent pas à l'intérieur de la cellule, mais à sa surface. En effet, la mucine présente à la surface des cellules épithéliales intestinales joue un rôle protecteur contre le radical hydroxyl, en jouant le rôle de scavenger (Grisham *et al.* 1987). Cependant, la mucine se dépolymérise, diminuant ainsi sa viscosité (Grisham *et al.* 1987).

Dans le cas des maladies inflammatoires de l'intestin, il a été observé que le plasma de ces patients possédait moins de fer, de sélénium et de glutathion peroxydase

comparé au groupe témoin ou aux patients en rémission (Sturniolo *et al.* 1998). Par contre, aucune différence n'a été observée quant aux niveaux de zinc et de cuivre plasmatiques. Au niveau de la muqueuse, les concentrations de zinc, de cuivre, de métallothionéine, d'acide ascorbique réduit et l'activité de la Cu-Zn-SOD, de la gamma-glutamylcystéine synthétase et de la gamma-glutamyl transférase sont réduits, alors que celles du fer et de la glutathion peroxydase sont augmentées (Buffinton *et al.* 1995a, Lih-Brody *et al.* 1996, Sido *et al.* 1998, Sturniolo *et al.* 1998). De surcroît, des niveaux anormalement bas de cystéine et de cystine ont été trouvés dans la muqueuse, expliquant la diminution de la concentration en glutathion (Sido *et al.* 1998). Les niveaux d' α -tocophérol sont par contre inchangés (Buffinton *et al.* 1995b). En outre, les niveaux de résidus carbonyles des protéines, d'oxydation de l'ADN et d'espèces réactives de l'oxygène sont augmentés au niveau de la muqueuse des patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (Lih-Brody *et al.* 1996).

D'autres protéines sont impliquées dans la défense des cellules intestinales contre le stress oxydant. C'est le cas de la heat shock protein 72 (hsp 72), dont l'augmentation de l'expression par les glucocorticoïdes permet de maintenir la viabilité cellulaire malgré la présence d'un stress oxydant (Urayama *et al.* 1998).

5.3.2. Les antioxydants alimentaires :

Le sélénium semble être un élément important pour les cellules intestinales. En effet, il a été démontré chez les cellules Caco-2, qu'une déficience en sélénium (comme c'est le cas dans la plupart des milieux de culture), entraînait une déficience de l'activité de la glutathion peroxydase (l'ajout de 1 mM de sélénium est suffisant pour atteindre le maximum d'activité de la glutathion peroxydase) (Baker *et al.* 1998). De surcroît, une supplémentation en acides aminés peut augmenter les niveaux de glutathion dans la muqueuse intestinale en stimulant la synthèse de ce dernier (Aw 1994). La nutrition joue un rôle important, car une malnutrition protéique chez le rat augmente les niveaux de peroxydation lipidique et l'activité de la catalase (Darmon *et al.* 1993). En outre, la

privation de nourriture diminue significativement le contenu de glutathion dans le jéjunum, l'iléon et le colon (Jonas *et al.* 1999, Ogasawara *et al.* 1989).

L'acide cafféique phenethyl ester, un produit du propolis a démontré un pouvoir antioxydant dans le cas d'ischémie-reperfusion. En effet, cet acide inhibe les dommages causés par la reperfusion, mais également l'infiltration des PMN (Koltuksuz *et al.* 1999).

Le tyrosol, ou 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol, composé phénolique majeur de l'huile d'olive, peut inhiber les effets néfastes d'agents pro-oxydants. En effet, chez les cellules Caco-2, le tyrosol permet d'inhiber les dommages cellulaires induits par les LDL oxydées (Giovannini *et al.* 1999). Un autre polyphénol de l'huile d'olive, le (3,4-Dihydroxyphenyl)-ethanol, possède également des propriétés antioxydantes, ce qui lui permet d'inhiber les altérations cellulaires induites par le peroxyde d'hydrogène (Manna *et al.* 1997). Cependant, tous les polyphénols de l'huile d'olive n'ont pas ces propriétés antioxydantes cytoprotectives ; en effet, le (p-hydroxyphenyl)ethanol n'arrive pas à inhiber les altérations cellulaires induites par le peroxyde d'hydrogène (Manna *et al.* 1997). D'autre part, la quercetine, le plus abondant flavonoïde dans la diète alimentaire, inhibe la cassure simple-brin d'ADN induite par le peroxyde d'hydrogène au niveau du colon (Duthie *et al.* 1999).

Les phytates du maïs et du soja ont également un effet protecteur contre la peroxydation lipidique induite par le fer au niveau du colon (Porres *et al.* 1999). En outre, la pectine diminue significativement les dommages subis par la muqueuse intestinale suite à un traitement générant des radicaux peroxy ou hydroxyl (Kohen *et al.* 1993), montrant ainsi l'importance des fibres alimentaires dans la lutte contre le stress oxydant.

La vitamine C et le mannitol ont une action protectrice sur la muqueuse intestinale, en atténuant les dommages induits par l'ischémie-reperfusion par diminution de la peroxydation lipidique et par augmentation des niveaux de GSH intracellulaires (Gunel *et al.* 1998). La vitamine E, bien qu'augmentant les niveaux de GSH, n'a pas réussi à diminuer la peroxydation lipidique et les dommages au niveau de la muqueuse (Gunel *et al.* 1998). Cependant, dans un modèle de surcharge en fer, la vitamine E ou le

cobalt diminuent les niveaux de peroxydation lipidique (Inan *et al.* 1998). Cela montre qu'un antioxydant peut être efficace dans un modèle, mais pas dans un autre.

Nous avons vu que le zinc est important pour la fonction stabilisante de la Cu-Zn-SOD. Il est cependant intéressant de voir qu'une carence en zinc provoque une augmentation de l'activité de la Cu-Zn-SOD sans surexpression du gène codant pour cette enzyme (ni l'ARNm, ni la protéine ne sont surexprimés) (Virgili *et al.* 1999). Mais, fait intéressant, l'activité de la catalase et de la glutathion peroxydase est diminuée, expliquant pourquoi la résistance à la peroxydation lipidique est diminuée (Virgili *et al.* 1999).

Nous avons également vu que le β -carotène possédait des actions antioxydantes, notamment en inactivant les radicaux peroxylys et alkoxylys lipidiques. Une autre propriété antioxydante du β -carotène est basée sur le fait qu'il peut augmenter l'activité de la glutathion peroxydase (van Lieshout *et al.* 1998).

Une étude a démontré un effet intéressant des huiles de poissons. En effet, ces huiles augmentent l'activité de la glutathion reductase, de la glutathion peroxydase, de la glutathion-S-transférase et de la catalase au niveau de l'intestin grêle soumis à un stress oxydant induit par l'éthanol chez le rat (Kaur *et al.* 1998). De surcroît, même sans stress oxydant, les huiles de poissons induisent l'augmentation de l'activité de la glutathion-S-transférase, mais uniquement au niveau du jéjunum (Kakkar *et al.* 1995). Par contre, lors d'un diabète induit par la streptozotocine, les huiles de poissons, l'huile de tournesol et l'huile d'olive augmentent l'activité de la glutathion-S-transférase au niveau jéjunal (Kakkar *et al.* 1995).

Le stress oxydant existe donc au niveau de l'intestin, et bien qu'il ne semble pas être la conséquence de la pathologie, ses effets sur le tube digestif sont variés et modifient les fonctions normales de l'intestin. Peu d'études se sont concentrées sur le métabolisme des entérocytes suite à un stress oxydant. L'accent est toujours plus porté sur la viabilité des cellules ou de l'organe en général. Il est bien accepté maintenant que les personnes atteintes de maladies inflammatoires de l'intestin souffrent de malabsorptions nutritionnelles, et notamment lipidiques (Lepage *et al.* 1989, Levy *et al.* 1989). On observe également dans ces pathologies une quantité élevée d'espèces

réactives (Grisham *et al.* 1992, Lih-Brody *et al.* 1996, Mahida *et al.* 1989, Middleton *et al.* 1993, Simmonds *et al.* 1992, Williams *et al.* 1990). L'on sait déjà que l'inflammation en elle-même perturbe l'absorption et le transport intestinal des lipides, notamment par l'intervention de cytokines (Mehran *et al.* 1995). Cependant, peut-il y avoir un lien entre la malabsorption intestinale et les niveaux de stress oxydant élevés ? Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la peroxydation lipidique perturbe l'absorption et le transport des graisses alimentaires au niveau entérocytaire, ce qui participe à la malabsorption intestinale des graisses alimentaires. Pour cela, il semble judicieux de savoir si le modèle pro-oxydant fer-ascorbate un agent de peroxydation lipidique puissant au niveau entérocytaire, sans que la viabilité cellulaire ne soit perturbée. En second lieu, nous examinons les effets sur l'absorption intestinale des lipides alimentaires, sur la synthèse *de novo* des lipides et sur leur transport vers la circulation systémique. Enfin, il est nécessaire de trouver une molécule antioxydante capable de diminuer la peroxydation lipidique et de voir si les effets précédents, causés par le fer/ascorbate, sont corrigés.

Les bactéries intestinales sont connues pour être des éléments importants dans l'activation des processus inflammatoires locaux (Mac Dermott 1999), notamment par leurs lipopolysaccharides capables d'augmenter l'activité et l'expression protéique de l'enzyme COX-2 (Longo *et al.* 1998a et 1998b, Salvemini *et al.* 1995). En outre, l'on sait que les lipopolysaccharides sont capables d'engendrer un stress oxydant. Cela nous a amené à l'hypothèse de travail suivante : la peroxydation lipidique, induite par des lipopolysaccharides et/ou le fer-ascorbate, d'une part favorise l'invasion bactérienne, en perturbant la perméabilité intestinale, et d'autre part engendre l'apparition de facteurs pro-inflammatoires. Ainsi, les objectifs sont de vérifier si les lipopolysaccharides provoquent une peroxydation lipidique au niveau entérocytaire et si l'effet est exacerbé par le fer-ascorbate, sans que la viabilité cellulaire ne soit perturbée. Par la suite, il faut observer les conséquences sur la fluidité membranaire et la perméabilité paracellulaire, voie d'accès possible pour les bactéries et voir si l'activité et l'expression de COX-2 sont augmentés. Enfin, il semble intéressant de voir si le butyrate, utilisé dans le traitement des maladies inflammatoires intestinales, possède des effets antioxydants, capables de contrer la peroxydation lipidique et ses conséquences.

ARTICLE 1

Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins

F. COURTOIS,^{1,2} I. SUC,¹ C. GAROFALO,^{1,2} M. LEDOUX,² E. SEIDMAN,^{1,3} AND E. LEVY^{1,2}

¹Centre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine, and Departments of ²Nutrition and

³Pediatrics, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5

Received 30 July 1999; accepted in final form 4 January 2000

Courtois, F., I. Suc, C. Garofalo, M. Ledoux, E. Seidman, and E. Levy. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G12–G19, 2000.—Although oxidative stress has been implicated in development of gut pathologies, its role in intestinal fat transport has not been investigated. We assessed the effect of Fe²⁺-ascorbate-mediated lipid peroxidation on lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly and secretion. Incubation of postconfluent Caco-2 cells with iron(II)-ascorbate (0.2 mM/2 mM) in the apical compartment significantly promoted malondialdehyde formation without affecting sucrose activity, transepithelial resistance, DNA and protein content, and cell viability. However, addition of the oxygen radical-generating system reduced 1) [¹⁴C]oleic acid incorporation into cellular triglycerides (15%, *P* < 0.0002) and phospholipids (16%, *P* < 0.0005); 2) de novo synthesis of cellular apolipoprotein A-I (apo A-I) (18%, *P* < 0.05), apo A-IV (38%, *P* < 0.05), and apo B-48 (45%, *P* < 0.003) after [³⁵S]methionine addition; and 3) production of chylomicrons (50%), VLDL (40%), LDL (37%), and HDL (30%) (all *P* < 0.0001). In contrast, increased total cellular cholesterol formation (96%, *P* < 0.0001), assayed by [¹⁴C]acetate incorporation, was noted, attributable to marked elevation (70%, *P* < 0.04) in activity of DL-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, the rate-limiting enzyme in cholesterol synthesis. The ratio of Acyl-CoA to cholesterol acyltransferase, the esterifying cholesterol enzyme, remained unchanged. Fe²⁺-ascorbate-mediated lipid peroxidation modifies intracellular fat absorption and may decrease enterocyte efficiency in assembling and transporting lipids during gut inflammation.

oxidative stress; intestine; apolipoproteins; fat malabsorption

REACTIVE OXYGEN SPECIES play an important role in health and disease (for review, see Refs. 17 and 20). They are generated as by-products of aerobic metabolism or produced by phagocytic cells (neutrophils, macrophages) as a nonspecific defense mechanism against intruding organisms (2, 7). The presence of potent cellular detoxification systems minimizes radical generation, terminates radical processes, and repairs damaged macromolecules (12). However, continued overproduction of reactive oxygen species and free radicals can overwhelm antioxidant defense and become deleterious

to cellular biological processes and tissue functions. In this case, reactive oxygen species may cause transient or permanent damage to cellular constituents, including nucleic acids, proteins, lipids, and membranes (1, 39, 43). In addition, iron-catalyzed lipid peroxidation produces marked perturbations in plasma lipid transport and hepatobiliary sterol metabolism (6). Nevertheless, the mechanisms involved in these metabolic derangements remain obscure and warrant further studies using cell cultures to identify the specific organ(s) behind the reported qualitative and quantitative changes.

The gastrointestinal mucosa is constantly exposed to luminal oxidants from ingested foods (8, 13, 35). Foods of animal origin contain varying concentrations of lipid oxidation products, depending on the severity of processing and storage. For example, 30 types of cholesterol oxides have been found in cholesterol-containing foods for human consumption (34, 37, 44). Similarly, iron salts and ascorbic acid, frequently consumed together in multiple-vitamin preparations or ingested foods, form reactive hydroxyl radicals. Intraluminal catalase-negative bacteria produce large quantities of H₂O₂. Oxidase, such as xanthine oxidase from desquamated cells, also amplifies the generation of reactive oxygen metabolites (35, 36). Even saliva contains hypothiocyanous acid, formed from the interaction between salivary peroxidases with H₂O₂ and thiocyanate, which may increase luminal reactive oxygen metabolite content (35, 36). Clearly, the ingestion and/or occurrence of peroxides may have implications for human health, particularly in the long term. In this regard, reactive oxygen metabolites have been said to be responsible for injury to the intestinal mucosa in several disease states, including intestinal ischemia and subsequent reperfusion, as well as inflammatory bowel disease (30). As to the exact fate of fat uptake and transport after peroxidative attack directed toward the brush-border membrane, very little information is available. Although intestinal malabsorption has been reported in inflammatory bowel disease, no thorough investigation has been carried out to examine enterocyte lipid processing subsequent to lipid peroxidation. The present experiments were, therefore, undertaken to exam-

Address for reprint requests and other correspondence: E. Levy, Gastroenterology Unit, Hôpital Sainte-Justine, 3175 Côte Ste-Catherine Rd., Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

ine the possible effects of the Fe^{2+} -ascorbate oxygen-radical generating system on lipid esterification and synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein assembly and secretion.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. Caco-2 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown at 37°C with 5% CO_2 in MEM (GIBCO BRL, Grand Island, NY) containing 1% penicillin/streptomycin and 1% MEM nonessential amino acids (GIBCO BRL) and supplemented with 10% decomplexed fetal bovine serum (FBS; Flow, McLean, VA). Caco-2 cells (passages 30–40) were maintained in T-75 cm^2 flasks (Corning Glass Works, Corning, NY). Cultures were split (1:6) when they reached 70–90% confluence, using 0.05% trypsin-0.5 mM EDTA (GIBCO BRL). For individual experiments, cells were plated at a density of 1×10^6 cells/well on 24.5-mm polycarbonate Transwell filter inserts with 0.4- μm pores (Costar, Cambridge, MA), in MEM (as described above) supplemented with 5% FBS. The inserts were placed into six-well culture plates, permitting separate access to the upper and lower compartments of the monolayers. Cells were cultured for 20 days, a period at which the Caco-2 cells are highly differentiated and appropriate for lipid synthesis (31, 32). The medium was refreshed every second day.

Iron(II)-ascorbate (1:10, Sigma, Montreal, PQ, Canada) was then added to cells at different concentrations for 24 h. Sucrase activity was measured as a marker of cell differentiation and transepithelial resistance as a marker of monolayer integrity (Millipore, Bedford, MA) (31, 32). Cell viability was assessed by trypan blue exclusion (32). Furthermore, DNA and protein content was evaluated as previously described (29, 32). All these parameters were tested in the presence or absence of Fe^{2+} -ascorbate.

Estimation of lipid peroxidation. Caco-2 cells were cultured in the presence or absence of Fe^{2+} -ascorbate. The reaction was terminated by the addition of 0.2% butylated hydroxytoluene (2,6-di-*t*-butyl-*p*-cresol, BHT, Sigma) to measure malondialdehyde (MDA), as an index of lipid peroxidation. The amount of free MDA formed during the reaction was determined by HPLC as described previously (6). Proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate (Na_2WO_4) (Aldrich Chemical) solution, and protein-free supernatant was then reacted with an isovolume of 0.5% thiobarbituric acid (Sigma) solution at 90°C for 30 min. After cooling to room temperature, chromogene was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in KH_2PO_4 /methanol (70:30, pH 7.0) mobile phase before MDA detection by HPLC.

Measurement of lipid synthesis and secretion. Lipid synthesis and secretion were assayed as previously described (32, 42). Briefly, radiolabeled [^{14}C]oleic acid (sp act, 53 mCi/mmol; Amersham, Oakville, ON, Canada) was added to unlabeled oleic acid and then solubilized in fatty acid-free BSA [BSA/oleic acid, 1:5 (mol:mol)]. The final oleic acid concentration was 0.7 mM (0.45 μCi)/well. Cells were first washed with PBS (GIBCO), and the [^{14}C]oleic acid-containing medium was added to the upper compartment. Fe^{2+} -ascorbate (0.2 mM:2 mM) was added to the upper chamber in serum-free MEM. At the end of a 24-h incubation period, cells were washed, then scraped with a rubber policeman in a PBS solution containing antiproteases (phenylmethylsulfonyl fluoride, pepstatin, EDTA, aminocaproic acid, chloramphenicol, leupeptin, glutathione, benzamidine, dithiothreitol, sodium azide, and Trasylol, all at a final concentration of 1 mM). An aliquot was taken for lipid extraction by standard methods (27) in the presence

of unlabeled carrier [phospholipids (PL), monoglycerides, diglycerides, triglycerides (TG), free fatty acids, free cholesterol (FC), and cholesteryl ester (CE)].

The various lipid classes synthesized from [^{14}C]oleic acid were then separated by TLC using the solvent mixture of hexane, ether, and acetic acid (80:20:3, vol/vol/vol), as previously described (27, 28). The area corresponding to each lipid was scratched off the TLC plates, and the silica powder was placed in a scintillation vial with Ready Safe counting fluid (Beckman, Fullerton, CA). Radioactivity was then measured by scintillation counting (LS 5000 TD, Beckman). Cell protein was quantified by the Bradford method, and results were expressed as dpm per milligram of cell protein. Lipid secreted in the basolateral compartment was analyzed and quantified, as described above, after centrifugation (2,000 rpm for 30 min at 4°C) to remove cell debris.

Cholesterol biogenesis was evaluated employing [^{14}C]acetate as precursor (53.9 Ci/mmol) after a 24-h incubation period. Separation of FC and CE was performed by TLC.

Lipid carrier. Blood was drawn 2 h after the oral intake of a fat meal by human volunteers, and postprandial plasma was prepared to serve as a carrier for the lipoproteins synthesized by Caco-2 cells. The TG-enriched plasma was incubated at 56°C for 1 h to inactivate enzymatic activity in the presence of antiproteases.

Isolation of lipoproteins. For the determination of secreted lipoproteins, Caco-2 cells were incubated with the lipid substrate as described above, in the presence or absence of Fe^{2+} -ascorbate. The medium supplemented with antiproteases (as described above) was first mixed with a plasma lipid carrier (4:1, vol/vol) to efficiently isolate de novo lipoproteins synthesized. The lipoproteins were then isolated by sequential ultracentrifugation using a TL-100 ultracentrifuge (Beckman), as described previously (27, 28). Briefly, chylomicrons were isolated after ultracentrifugation (20,000 rpm for 20 min). Very low-density lipoprotein (VLDL) (1.006 g/ml) and low-density lipoprotein (LDL) (1.063 g/ml) were separated by spinning at 100,000 *g* for 2.26 h with a tabletop ultracentrifuge 100.4 rotor at 4°C. The high-density lipoprotein (HDL) fraction was obtained by adjusting the LDL infranant to density at 1.21 g/ml and centrifuging for 6.5 h at 100,000 *g*. Each lipoprotein fraction was exhaustively dialyzed against 0.15 M NaCl and 0.001 M EDTA, pH 7.0, at 4°C for 24 h.

De novo apolipoprotein synthesis. The effect of Fe^{2+} -ascorbate on newly synthesized and secreted apolipoprotein A-I (apo A-I), apo A-IV, apo B-48, apo B-100, and apo E was assessed as described previously (25). To first induce apolipoprotein synthesis, cells were incubated apically with unlabeled oleic acid bound to albumin in serum-free medium, 24 h before [^{35}S]methionine incubation. The concentration of the unlabeled lipid was equivalent to the labeled substrate described above. During this time, Fe^{2+} -ascorbate was again added to the apical chamber. After a 24-h incubation, cells as well as the outer chambers were rinsed twice with PBS (GIBCO). The apical compartment was replaced with 1.5 ml of methionine-free medium containing the unlabeled substrate and [^{35}S]methionine (100 μCi /ml) (Amersham Life Sciences, 50 mCi/mmol). After incubation for 3 h at 37°C with 5% CO_2 , the medium from the basolateral compartment was collected. Cells were scraped off the inserts in the cell lysis buffer, as described above. The medium and cell lysates were supplemented with the antiprotease cocktail. To assay a considerable amount of de novo apolipoprotein synthesis, the material from two wells was pooled.

Immunoprecipitation of apolipoproteins. The medium and cell lysates were first supplemented with unlabeled methionine to act as a carrier (final concentration, 0.1 mM). Immuno-

precipitation was performed in the presence of excess polyclonal antibodies to human apolipoproteins (Boehringer Mannheim) at 4°C overnight (25, 26). Samples were then washed with Nonidet P-40 (0.05%). They were subsequently centrifuged and resuspended in sample buffer (1.2% SDS, 12% glycerol, 60 mM Tris, pH 7.3, 1.2% β -mercaptoethanol, and 0.003% bromophenol blue) and analyzed by a linear 4–15% polyacrylamide gradient preceded by a 3% stacking gel, as described previously. Radioactive molecular weight standards (Amersham Life Sciences) were run in the same conditions. Gels were sectioned into 2-mm slices and counted after an overnight incubation with 1 ml of Beckman tissue solubilizer (0.5 N quaternary ammonium hydroxide in toluene) and 10 ml of liquid scintillation fluid (Ready Organic, Beckman). Results for each apolipoprotein studied were expressed as percent dpm/mg protein to assess the specific effect of Fe^{2+} -ascorbate on apolipoprotein synthesis and secretion.

Preparation of microsomes. Microsome fractions were prepared as previously described (22). Briefly, Caco-2 cells were incubated with Fe^{2+} -ascorbate for 24 h and then rinsed, homogenized, and centrifuged for 10 min at 10,000 g at 4°C. The supernatant fraction was centrifuged for 60 min at 100,000 g at 4°C. The washed microsomal pellets were quick frozen and stored at -80°C for later use.

Assay of microsomal HMG-CoA reductase activity. Microsomal enzymatic activity was assayed as described previously (6, 22). The reaction mixture contained 100 mmol/l potassium phosphate (pH 7.4), 150 μg microsomal protein, 20 mmol/l glucose-6-phosphate, 12.5 mmol/l dithiothreitol, 2.5 M NADP, and 1.2 U glucose-6-phosphate dehydrogenase. The reaction was initiated by the addition of [$^3\text{-}^{14}\text{C}$]-3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) (12,000 dpm/nmol). After incubation for 30 min at 37°C, the [^{14}C]mevalonate formed was converted into lactone, isolated by TLC, and counted using an internal standard to correct for incomplete recovery. HMG-CoA reductase activity was expressed as picomoles of mevalonate synthesized per milligram of protein per minute.

Microsomal ACAT activity. The standard acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) determination was based on our previous assay (6, 22). We added 5 nmol [^{14}C]oleoyl CoA (sp act, $\sim 10,000$ dpm/nmol) to the mixture containing 150 μg microsomal protein to initiate the reaction in a buffer solution (pH 7.5) consisting of cholesterol, 0.04 mol/l KH_2PO_4 , 50 mmol/l NaF, 0.25 mol/l sucrose, and 1 mmol/l EDTA. After incubation for 10 min at 37°C, the reaction was stopped by adding chloroform/methanol (2:1, vol/vol) followed by [^3H]cholesteryl oleate as an internal standard to estimate recovery.

Statistical analysis. All values were expressed as means \pm SE. Data were analyzed by two-tailed Student's t -test.

RESULTS

MDA generation after Fe^{2+} -ascorbate exposure. The effectiveness of Fe^{2+} -ascorbate in initiating lipid peroxidation was tested after incubation with Caco-2 cells. At the end of a 24-h culture period, the degree of lipid peroxidation was determined by measuring MDA in medium and cells. As illustrated in Fig. 1, Fe^{2+} -ascorbate promotes the production of peroxidation above baseline values, and the formation of MDA increased with rising Fe^{2+} -ascorbate concentrations in a dose-dependent manner. Neither Fe^{2+} nor ascorbate alone could induce lipid peroxidation (data not shown). The concentration-response relationship for intestinal epi-

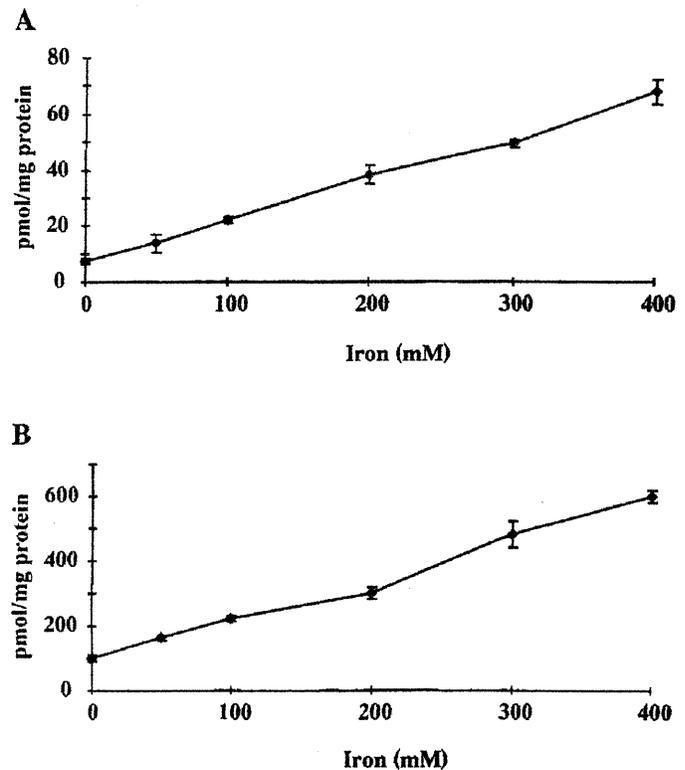


Fig. 1. Lipid peroxidation in Caco-2 cells challenged with Fe^{2+} -ascorbate (1:10). Caco-2 cells were incubated with increasing concentrations of Fe^{2+} -ascorbate for 24 h at 37°C. Iron concentrations shown on x-axis represent actual Fe^{2+} concentration along with a corresponding 10-fold higher ascorbate concentration at each Fe^{2+} amount. A concentration-dependent increase in equivalent malondialdehyde (MDA) formed was observed between 50 and 400 μM of Fe^{2+} in cells (A) and medium (B). Values are means \pm SE for 2 different experiments.

thelial peroxidation was 10-fold higher in the apical medium than in cells.

Effect of Fe^{2+} -ascorbate on Caco-2 cell functional integrity. Caco-2 cell integrity and viability were assessed by sucrose activity, cell monolayer transepithelial resistance, DNA and protein content, and trypan blue exclusion after an incubation of 24 h. As shown in Fig. 2, transepithelial resistance and sucrose activity remained unchanged with increasing concentrations of Fe^{2+} -ascorbate. Similarly, the cell DNA and protein content was unaffected by the addition of the oxygen-radical generating system. At all the Fe^{2+} -ascorbate concentrations tested, the cell protein-to-DNA ratio did not show any significant variability. Cell viability by trypan blue exclusion was also assessed and was uniformly $>90\%$ in the absence or presence of Fe^{2+} -ascorbate.

Effect of Fe^{2+} -ascorbate on lipid synthesis and secretion. Lipid synthesis and secretion were determined in the presence and absence of Fe^{2+} -ascorbate after a 24-h incubation period. When oleic acid bound to BSA was presented to confluent Caco-2 cell monolayers, the total fatty acid incorporation was decreased in cells with Fe^{2+} -ascorbate ($596,415 \pm 9,960$ dpm/mg protein) compared with cells without Fe^{2+} -ascorbate ($698,208 \pm 15,084$ dpm/mg protein). A similar trend was also noted

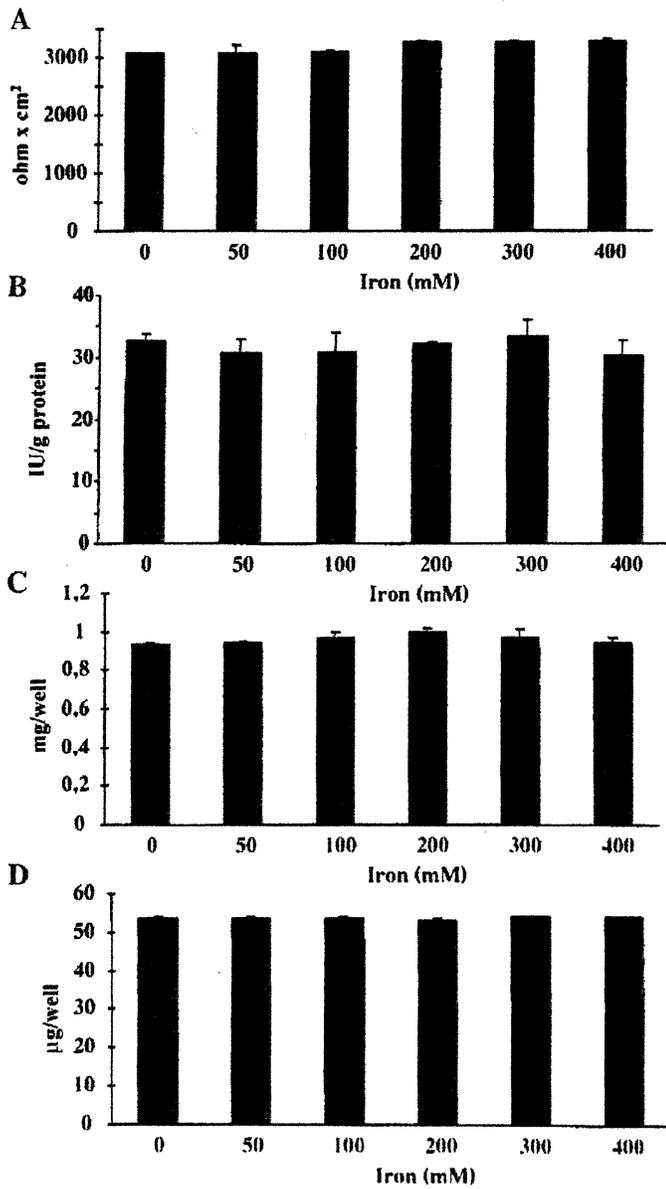


Fig. 2. Effect of increasing concentrations of Fe²⁺-ascorbate on transepithelial resistance (A), sucrase activity (B), cell protein content (C), and cell DNA content (D). Values are means ± SE for 2 separate preparations.

in the medium (18,436 ± 907 vs. 24,206 ± 580 dpm/mg protein for cells with or without Fe²⁺-ascorbate, respectively). This decrease was essentially accounted for by a reduction in TG (15%, *P* < 0.0002 in cells; 26%, *P* < 0.0001 in medium) and PL (16%, *P* < 0.0005 in cells; 17%, *P* < 0.03 in medium) (Fig. 3). In the second step of our studies, the effect of Fe²⁺-ascorbate on Caco-2 cell cholesterol biogenesis was evaluated using [¹⁴C]acetate. As can be seen in Fig. 4, Fe²⁺-ascorbate significantly increased the incorporation of the radiolabeled precursor into total cholesterol. The raised level of total cholesterol (96%, *P* < 0.0001 in cells; 142%, *P* < 0.03 in medium) was attributable to the increase of both fractions of FC (105%, *P* < 0.0001) and CE (67%, *P* < 0.0001) in Caco-2 cells and to FC (193%, *P* < 0.03) only in the medium.

Effect of Fe²⁺-ascorbate on microsomal sterol enzymes. In view of the impact of lipid peroxidation on cholesterol biogenesis, we determined the effect of Fe²⁺-ascorbate on HMG-CoA reductase (the rate-limiting enzyme in cholesterol synthesis) and ACAT (the enzyme responsible for the acylation of cholesterol into CE). The incubation of microsomal preparations from Caco-2 cells with Fe²⁺-ascorbate caused a marked elevation in HMG-CoA reductase activity (70%, *P* < 0.04) without altering ACAT activity (Fig. 5).

Effect of Fe²⁺-ascorbate on apolipoprotein synthesis. One of the major objectives of these studies was to examine the modulation of apolipoprotein elaboration by Fe²⁺-ascorbate. The treatment with the oxidant system resulted in a significantly reduced yield of the main apolipoproteins normally synthesized by the intestine: A-I (18%, *P* < 0.05), A-IV (38%, *P* < 0.05), and B-48 (45%, *P* < 0.03) (Fig. 6). Fe²⁺-ascorbate also affected the exocytosis of apo B-100 (35%, *P* < 0.02), apo B-48 (36%, *P* < 0.003), and apo A-IV (58%, *P* < 0.0008).

Effect of Fe²⁺-ascorbate on lipoprotein secretion. As expected from the inhibition of lipid synthesis and apolipoprotein biogenesis, Fe²⁺-ascorbate affected the secretion of all four classes of lipoproteins studied (Fig. 7). A significant reduction was noted in chylomicrons (50%, *P* < 0.0001), VLDL (40%, *P* < 0.0001), LDL (37%, *P* < 0.0001), and HDL (30%, *P* < 0.0001) as shown in Fig. 7.

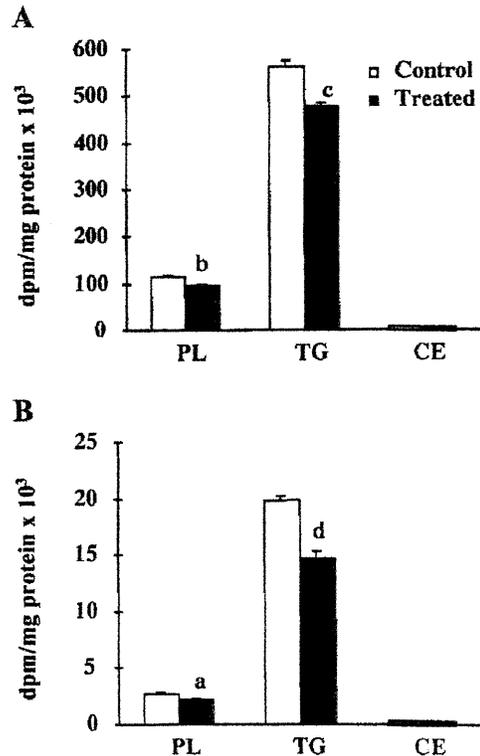


Fig. 3. Effect of Fe²⁺-ascorbate on Caco-2 cell lipid synthesis and secretion. Fe²⁺-ascorbate was incubated in apical compartment for 24 h, with [¹⁴C]oleic acid as substrate. Cells were harvested and basolateral medium was collected for de novo cell (A) and medium (B) lipid synthesis as described in MATERIALS AND METHODS. Values are means ± SE for 6 different experiments. PL, phospholipids; TG, triglycerides; CE, cholesteryl ester. ^a*P* < 0.03; ^b*P* < 0.0005; ^c*P* < 0.0002; ^d*P* < 0.0001.

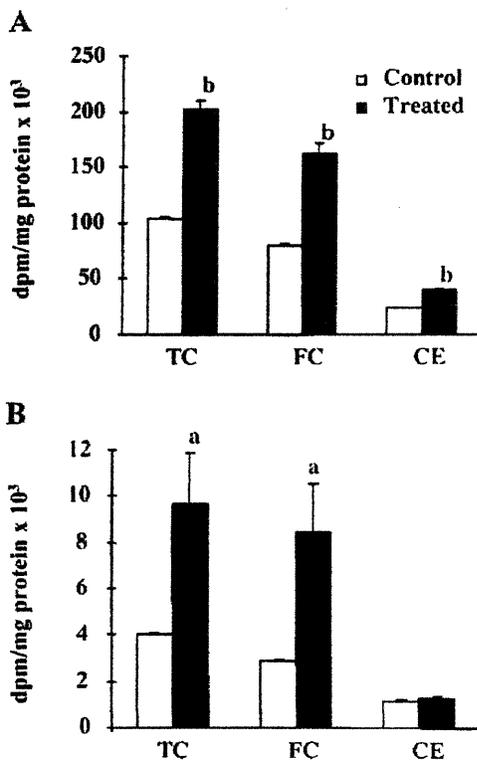


Fig. 4. Effect of Fe^{2+} -ascorbate on Caco-2 cell cholesterol synthesis and secretion. Fe^{2+} -ascorbate was incubated in the apical compartment for 24 h, with $[^{14}\text{C}]$ acetate as a precursor. Cells were harvested and basolateral medium was collected for de novo cell (A) and medium (B) cholesterol synthesis as described in MATERIALS AND METHODS. Values are means \pm SE for 6 different experiments. TC, total cholesterol; FC, free cholesterol. ^a $P < 0.03$; ^b $P < 0.0001$.

Effect of BHT. To uncover whether lipid peroxidation was fully behind the aforementioned lipid and lipoprotein alterations, Caco-2 cells were cultured in the presence of BHT before incubation with Fe^{2+} -ascorbate. As noted in Table 1, the preincubation of Caco-2 cells with BHT led to a protection against Fe^{2+} -ascorbate-mediated lipid peroxidation. Indeed, BHT in contrast to other antioxidants tested, such as vitamin E and glutathione (results not shown), was effective in reducing MDA generation. Concomitantly, BHT im-

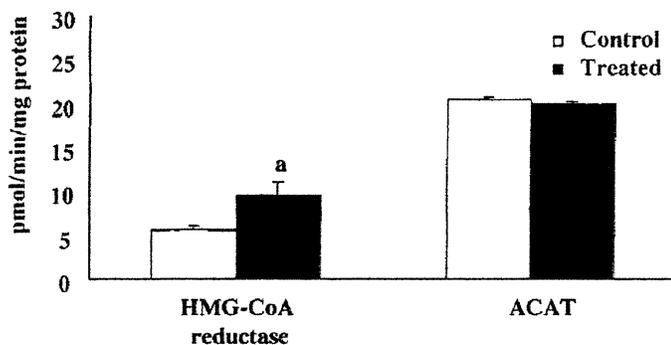


Fig. 5. Influence of Fe^{2+} -ascorbate on key regulatory enzymes. Caco-2 cells were incubated with Fe^{2+} -ascorbate for 24 h at 37°C. Thereafter, microsomes were isolated and assayed for DL-3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase and acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) as described in MATERIALS AND METHODS. ^a $P < 0.04$.

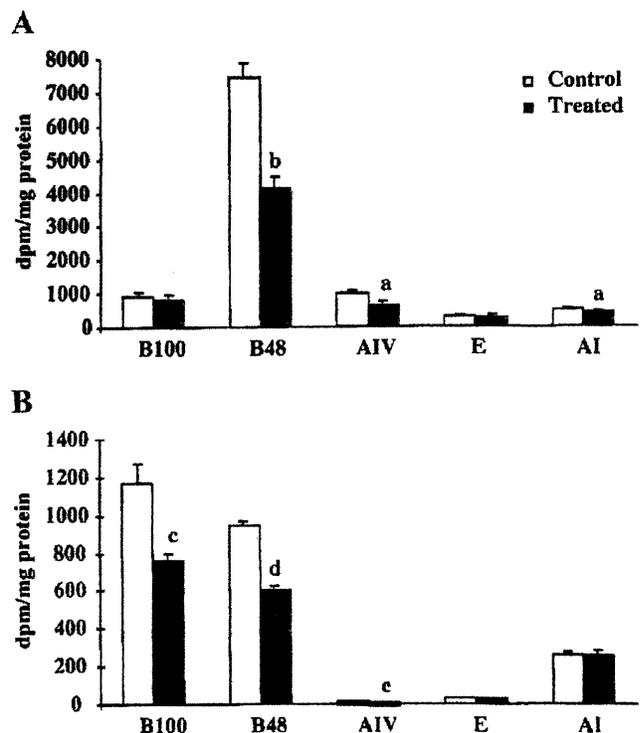


Fig. 6. Effect of Fe^{2+} -ascorbate on Caco-2 cell apolipoprotein synthesis. Fe^{2+} -ascorbate was incubated in apical compartment for 20 h with unlabeled oleic acid to stimulate apolipoprotein biogenesis. Apolipoproteins A-I, A-IV, B-100, B-48, and E were analyzed after a 3-h incubation with $[^{35}\text{S}]$ methionine by SDS gel electrophoresis. Values, relative to cells (A) and medium (B), represent means \pm SE for 3 separate experiments. Results are expressed as dpm/mg cellular protein. ^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.03$; ^c $P < 0.02$; ^d $P < 0.0003$; ^e $P < 0.0008$.

proved lipid esterification, cholesterol synthesis, and CM formation.

DISCUSSION

The Caco-2 cell line has been used to examine a variety of intestinal functions, including nutrient absorption (24). This intestinal model forms a highly polarized monolayer, exhibits many of the features of small intestinal cells, and displays vectorial transport.

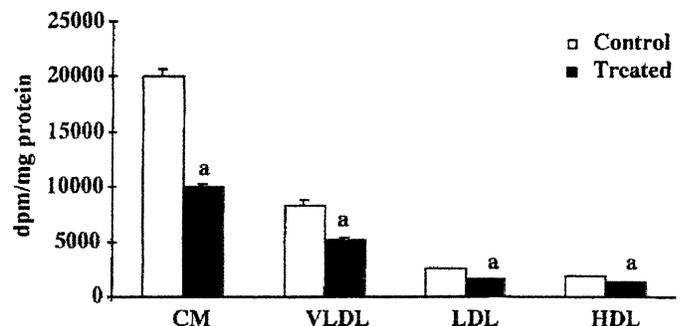


Fig. 7. Effect of Fe^{2+} -ascorbate on Caco-2 cell lipoprotein secretion. Fe^{2+} -ascorbate was incubated in the apical compartment for 20 h, with $[^{14}\text{C}]$ oleic acid as a precursor. Cells were harvested and basolateral medium was collected for lipoprotein isolation as described in MATERIALS AND METHODS. Values are means \pm SE for 6 separate experiments. CM, chylomicrons; VLDL, very low-density lipoprotein; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein. ^a $P < 0.0001$.

Table 1. Influence of BHT on Fe^{2+} -ascorbate-mediated lipid derangements

	%MDA		%Total Incorporation of [14 C]acetate into Cholesterol		%Total Incorporation of [14 C]oleate into Lipids		%Incorporation of [14 C]oleate into CM in Medium
	Cells	Medium	Cells	Medium	Cells	Medium	
Fe^{2+} -ascorbate	+438	+199	-14.6	-23.8	95.9	142.1	-49.8
Fe^{2+} -ascorbate + BHT	+9	+59	-0.9	-20.2	10.0	5.4	-23.1

BHT, butylated hydroxytoluene; MDA, malondialdehyde; CM, chylomicrons.

Because Caco-2 cells reproduce several of the normal physiological responses to various modulatory agents, we examined their usefulness to study the effect of Fe^{2+} -ascorbate-induced lipid peroxidation on the intracellular phase of lipid absorption, i.e., intraenterocyte esterification and resynthesis of lipolytic products, the biogenesis of apolipoproteins required for TG-rich particles, and lipoprotein secretion. Our results show for the first time that Fe^{2+} -ascorbate can clearly affect the efficiency of Caco-2 cells to assemble and transport lipids in lipoprotein forms.

Iron occupies a central role in oxygen-radical chemistry, because it can initiate oxygen radical formation (9). Not only is iron a catalyst in the Haber-Weiss reaction, but it is also involved in the initiation and propagation of lipid peroxidation (14). Although the mechanisms underlying the cytotoxicity of iron in different organs are not completely understood, many reports have pointed to the participation of iron-mediated peroxidation in numerous pathological states, including atherosclerosis (38), cancer (16), ischemia-reperfusion injury (10), inflammatory bowel disease (35), and conditions of iron overload (4). Several laboratories (3, 5, 19) have shown the ability of Fe^{2+} to initiate strong lipid peroxidation, whereas ascorbic acid can amplify the oxidative potential of iron by promoting metal ion-induced lipid peroxidation. The data presented here clearly indicate that the Fe^{2+} -ascorbate system functioned as a producer of lipid peroxidation and, at the same time, altered the integrity of intracellular fat transport. It is noteworthy that the iron dose used in the current study is comparable to normal iron concentration in the gut (2). The deteriorations resulting from the exposure of Caco-2 cells to Fe^{2+} -ascorbate are probably attributable to oxidative stress, because the addition of the BHT antioxidant simultaneously prevented the occurrence of lipid peroxidation and improved the cellular processes of lipid absorption. Previous studies (19) have addressed the issue of glucose transport under the influence of *in vitro* peroxidation, employing guinea pig brush-border membrane vesicles. The peroxidative attack, initiated by Fe^{2+} -ascorbate, resulted in the reduction of sodium-dependent glucose transport (19). All these data, taken together, strongly support the causative derangement of nutrient transport by oxidative stress.

Numerous studies have already emphasized that essential fatty acids are absolutely necessary for 1) the control of microviscosity and membrane fluidity of most cells (3), 2) the regulation of membrane protein (5), and 3) the synthesis of eicosanoids, such as prostaglandins,

leukotrienes, and related substances that have a profound influence on many transport processes (23, 40). Our understanding of how lipid peroxidation influences the intestinal phase, i.e., the formation of lipid-carrying lipoproteins, remains sketchy. Nevertheless, it is tempting to assume that a peroxidative attack on membranes could deplete essential fatty acid content, thereby modifying intracellular fat transport. Accordingly, our previous work (23) stressed the critical role of essential fatty acid deficiency in the biophysical and biochemical events involved in fat absorption. The peroxidative modification of unsaturated phospholipids in the endoplasmic reticulum (the site of lipid esterification, apolipoprotein synthesis, and lipoprotein assembly) could conceivably hamper enterocyte lipid transport. Ongoing exploration of the mechanisms involved will have an important bearing on our understanding of disease states associated with peroxidative stress, such as inflammatory bowel diseases (35). In particular, Crohn's disease is known for its overproduction of harmful oxidants, which have been implicated in the pathophysiology of chronic inflammation and intestinal injury. Peroxidative damage to the absorptive epithelial cells is likely a major contributor to impaired transport of electrolytes, trace metals, and vitamins as well as other micronutrients. Given the negative influence of both cytokines (32) and essential fatty acid deficiency (23) on fat absorption, our data suggest that the combination of excessive proinflammatory cytokines and lipid peroxidation may give rise to disturbances in epithelial absorptive processes in inflammatory bowel diseases, such as impaired lipid transport. However, studies have not yet clearly identified whether essential fatty acid deficiency and lipid soluble vitamin depletion are the result of malabsorption vs. inadequate intake to meet needs.

We (6) previously determined the effect of iron overload on plasma lipid profile and lipoprotein composition in rats administered a diet enriched with 3% iron carbonyl. The latter dietary regimen provoked marked hyperlipidemia, evidenced by the concomitant increase in plasma TG and cholesterol. In addition, various chemical abnormalities characterized the composition and size of lipoproteins. These disturbances were correlated with lipid peroxidation as reflected by elevated MDA concentrations. However, in the current study, Caco-2 cells submitted to lipid peroxidation displayed defective lipoprotein production. In view of this compromised intestine lipoprotein secretion, it is therefore tempting to suggest that the *in vivo* hyperlipoproteinemia identified in rats with iron loading is attributable

to liver hypersecretion only. Additional work is needed to clarify this important issue.

The experiments performed in the current study were aimed at defining whether iron-catalyzed lipid peroxidation could modify intestinal cholesterol metabolism. Our data revealed that de novo cholesterologenesis, assessed by the incorporation of [¹⁴C]acetate, was markedly increased in treated Caco-2 cells. This was associated with a significant enhancement of HMG-CoA reductase activity. At this time, we are not able to specify whether iron-catalyzed lipid peroxidation modulates the enzyme activity by altering its concentration through transcriptional or posttranscriptional modifications. Iron-catalyzed lipid peroxidation also may attack polyunsaturated fatty acids, resulting in changes in the physical properties of the fluidity of the membrane in which HMG-CoA reductase is embedded. Such indirect effects have been shown to alter the immediate environment of the enzyme, thereby affecting its function (11, 41).

Unlike HMG-CoA reductase, ACAT activity was resistant to iron-induced lipid peroxidation. Furthermore, concurrent to iron-catalyzed peroxidation in the livers of rats with iron overload, the activities of the two enzymes were dissimilar; HMG-CoA reductase was suppressed while ACAT was activated (6). Apparently, the two enzymes respond to peroxidative stress differently.

Apolipoproteins are necessary for exogenous and endogenous lipid transport. Their biosynthesis is a principal determinant of plasma lipoprotein levels, and defects in their synthesis or function affect lipoprotein metabolism (21). Our study showed that iron-catalyzed lipid peroxidation resulted in diminished newly synthesized apolipoproteins. Even the biogenesis of apo B that is crucial for the assembly and exocytosis of TG-rich lipoprotein was markedly impaired. At present, the mechanisms involved in these abnormalities are not elucidated, including apo B elongation or translation, the rate of apo B translocation across the endoplasmic reticulum, and intracellular degradative pathway of apo B (18). Similarly, Murthy et al. (33) found that less newly synthesized apo B was secreted by cells incubated with 13-hydroxyoctadecadienoic acid, an oxidized lipid. Murthy et al. (33) suggested that defective apo B translocation was responsible for the reduced apo B secretion. Furthermore, the original observation that the diminished synthesis of apo A-IV, apo B, and lipoprotein caused by Fe²⁺-ascorbate could be attributed to its direct effects on TG production is unlikely. The incubation of Caco-2 cells with Fe²⁺-ascorbate in the absence of oleic acid, the main precursor of TG biogenesis, resulted in similar differences between control and treated cells (results not shown).

In summary, the Fe²⁺-ascorbate system appeared to be very effective in promoting lipid peroxidation of Caco-2 cells in view of the markedly increased MDA levels. Concomitantly, it elicited a reduction in lipid esterification and synthesis, apolipoprotein biogenesis, and lipoprotein secretion. We conclude that long-lasting lipid peroxidation may overwhelm intraluminal antioxidant defense and impair intestinal fat transport.

We thank Danielle St-Cyr Huot for typing the manuscript.

This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10584) and the Canadian Foundation for Crohn's and Colitis.

REFERENCES

1. Ames BN. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat Res* 214: 41–46, 1989.
2. Babbs CF. Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic Biol Med* 13: 169–181, 1992.
3. Bachowski GJ, Thomas JP, and Girotti AW. Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photo-oxidized cell membranes: cholesterol product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids* 23: 580–586, 1988.
4. Bacon BR and Brown KE. Iron metabolism and disorders of iron overload. In: *Liver and Biliary Diseases*, edited by Kaplowitz N. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996, p. 349–362.
5. Brasitus TA, Davidson NO, and Schachter S. Variations in dietary triacylglycerol saturation alter the lipid composition and fluidity of rat intestinal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 812: 460–472, 1985.
6. Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M, and Levy E. Dietary iron overload and induced-lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism. *Hepatology* 29: 1809–1817, 1999.
7. Chance B, Sies H, and Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59: 527–603, 1979.
8. Cross CE, Halliwell B, and Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1: 1328–1330, 1984.
9. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc (Lond)* 65: 899–910, 1934.
10. Ferrari R, Alfieri O, Curello S, Ceconi C, Cargnoni A, Marzollo P, Pardini A, Caradonna E, and Visioli O. Occurrence of oxidative stress during reperfusion of the human heart. *Circulation* 81: 201–211, 1990.
11. Finkel RS and Volpe JJ. A potential role for PL in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in cultured C-6 glial cells. Effects of *N,N*-dimethylethanolamine. *Biochim Biophys Acta* 572: 461–471, 1979.
12. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875–880, 1978.
13. Grisham MB, Von Ritter C, Smith BF, LaMont JT, and Granger DN. Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 253: G93–G96, 1987.
14. Haber F and Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Lond Ser A* 147: 332–351, 1934.
15. Haenen GR and Bast A. Protection against lipid peroxidation by a microsomal glutathione-dependent labile factor. *FEBS Lett* 159: 24–28, 1983.
16. Halliwell B and Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1–85, 1990.
17. Halliwell B, Gutteridge JMC, and Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119: 598–620, 1992.
18. Innerarity TL, Boren J, Yamanaka S, and Olofsson SO. Biosynthesis of apolipoprotein B-48 containing lipoproteins. Regulation by novel post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 271: 2353–2356, 1996.
19. Jour'd'heuil D, Vaananen P, and Meddings JB. Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 264: G1009–G1015, 1993.
20. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23: 21–48, 1993.
21. Levy E. The genetic basis of primary disorders of intestinal fat transport. *Clin Invest Med* 19: 317–324, 1996.
22. Levy E, Garofalo C, Rouleau T, Gavino V, and Bendayan M. Impact of essential fatty acid deficiency on hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 23: 848–857, 1996.

23. **Levy E, Garofalo C, Thibault L, Dionne S, Daoust L, Lepage G, and Roy CC.** Intraluminal and intracellular phases of fat absorption are impaired in essential fatty acid deficiency. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 262: G319-G326, 1992.
24. **Levy E, Mehran M, and Seidman E.** Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 9: 626-635, 1995.
25. **Levy E, Sinnott D, Thibault L, Nguyen TD, Delvin E, and Ménard D.** Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Lett* 393: 253-258, 1996.
26. **Levy E, Thibault L, Delvin E, and Ménard D.** Apolipoprotein synthesis in human fetal intestine: regulation by epidermal growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 204: 1340-1345, 1994.
27. **Levy E, Thibault L, and Ménard D.** Intestinal lipids and lipoproteins in the human fetus: modulation by epidermal growth factor. *J Lipid Res* 33: 1607-1617, 1992.
28. **Loirdighi N, Ménard D, and Levy E.** Insulin decreases chylomicron production in human fetal small intestine. *Biochim Biophys Acta* 1175: 100-106, 1992.
29. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
30. **Ma TY.** Intestinal epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 214: 318-327, 1997.
31. **Mehran M, Levy E, Gurbindo C, Bendayan M, and Seidman EG.** Lipid apolipoprotein and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 33: 118-128, 1997.
32. **Mehran M, Seidman E, Marchand R, Gurbindo C, and Levy E.** Tumor necrosis factor- α inhibits lipids and lipoprotein transport by Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 269: G953-G960, 1995.
33. **Murthy S, Born E, Mathur S, and Field FJ.** 13-Hydroxy octadecadienoic acid (13-HODE) inhibits triacylglycerol-rich lipoprotein secretion by Caco-2 cells. *J Lipid Res* 39: 1254-1262, 1998.
34. **Nourooz-Zadeh J and Appelquist L-A.** Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: milk powder products. *J Food Sci* 53: 74-79, 1988.
35. **Parks DA.** Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 30: 293-298, 1989.
36. **Parks DA, Williams TK, and Beckman JS.** Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a re-evaluation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 254: G768-G774, 1988.
37. **Pie JE, Staphis K, and Seillan C.** Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *J Agric Food Chem* 39: 250-254, 1991.
38. **Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, and Steinberg D.** Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2995-2998, 1987.
39. **Sagai M and Ishinose T.** Age-related changes in lipid peroxidation as measured by ethane, ethylene, butane, and pentane in respired gases of rats. *Life Sci* 27: 731-738, 1980.
40. **Sinclair HM.** Essential fatty acids in perspective. *Hum Nutr Clin Nutr* 38: 245-260, 1984.
41. **Sipat AB and Sabine JR.** Membrane-mediated control of hepatic β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Biochem J* 194: 889-893, 1981.
42. **Spalinger JH, Seidman EG, Lepage G, Ménard D, Gavino V, and Levy E.** Uptake and metabolism of a structured triglyceride by Caco-2 cells: reversal of essential fatty acid deficiency. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275: G652-G659, 1998.
43. **Stadtman ER.** Protein oxidation and aging. *Science* 257: 1220-1224, 1992.
44. **Wahle KW, Hoffe PP, and McIntosh G.** Effects of storage and various intrinsic vitamin E concentrations on lipid oxidation in dried egg powders. *J Sci Food Agric* 61: 463-469, 1993.

ARTICLE 2

ROLE OF IRON/ASCORBATE AND RELATED LIPID PEROXIDATION IN LIPID TRANSPORT BY CACO-2 CELLS

(soumis dans Biochemical Journal, Décembre 2000)

Courtois F¹, Delvin E², Seidman E³, Ledoux M¹, Levy E¹

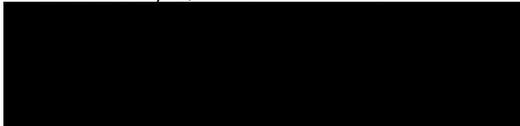
Departments of Nutrition¹, Pediatrics³ and Biochemistry²,
University of Montréal, and Centre de Recherche
Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

Acknowledgements:

This study was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MT-10584), the Canadian Foundation for Crohn's and Colitis, the Dairy Bureau of Canada, and by research scholarship awards from the FRSQ (EL, ES). The authors thank Mrs. Carole Garofalo and Nadia Dubé for their assistance and Mrs. Danielle St-Cyr Huot for typing the manuscript.

Address for correspondence:

Dr. Emile Levy
Hôpital Sainte-Justine
3175 Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec H3T 1C5



ABSTRACT

Although iron is the most abundant transition metal in biologic tissues and a potent catalyst of oxidative stress, its role in intestinal fat transport was poorly investigated. The objective of the current investigation was to delineate whether iron-mediated lipid peroxidation or iron alone affected the intracellular phase of fat transport. Caco-2 cells, an experimental intestinal model, supplemented with iron/ascorbate (0.2 mM:2 mM) displayed a 5-fold rise in malondialdehyde ($p < 0.001$). The administration of iron/ascorbate resulted in marked perturbations in lipid esterification (triglycerides, phospholipids), apolipoprotein (AI, A-IV, B) synthesis and lipoprotein (chylomicron, VLDL, LDL, HDL) secretion. Among various potential antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) was effective in reducing lipid peroxidation. While this antioxidant compound normalized cellular lipid esterification, cholesterol synthesis and apolipoprotein production, it was unable to completely correct the abnormal secretion of lipids and lipoproteins, which were induced by iron/ascorbate. Therefore, our studies demonstrated that iron-catalyzed free radical-mediated lipid peroxidation caused substantial derangements in intestinal fat transport, and that an increase in iron may directly exacerbate the assembly of lipoproteins in the enterocyte.

Keywords: Butylated hydroxytoluene, malondialdehyde, chylomicrons, VLDL, LDL, HDL, HMG-CoA reductase, AcylCoA:cholesterol acyltransferase, apolipoproteins.

INTRODUCTION

Much research has focused over the past decade on the role of reactive oxygen species in various physiological and pathological processes [1,2]. Whereas the presence of free radicals can translate into certain beneficial effects, their overproduction is cast in a negative light impairing cell functions [3,4]. Cellular lipids, proteins, nucleic acids and carbohydrates can be damaged by reacting with oxygen free radicals, resulting in metabolic disturbances.

Transition metal ions are important elements in the production of radical species [3]. Their capacity to move electrons constitutes the basis for the initiation and propagation of many toxic free radical reactions. The most abundant transition metal in biologic tissues is iron, a potent catalyst of oxidative stress that can rapidly generate free radical-mediated injury [5]. The deleterious effects of chronic excess of iron are well established in hemochromatosis, a genetic disorder prevalent in Caucasian population, as well as in other iron-overloading disorders [6,7]. The pathophysiological significance of iron-mediated oxygen free radicals has been implicated in many human conditions, including carcinogenesis, coronary artery disease, inflammation, aging, neurodegenerative disease and stroke [2,8].

The gastrointestinal mucosa is subject to prolonged oxidative stress from reactive oxygen species generated during the course of aerobic metabolism [9,10]. Potential sources of reactive oxygen species include epithelial cells xanthine, amine and aldehyde oxidases and NADPH oxidase in resident macrophages [11]. The influx of neutrophils and monocytes associated with inflammation can generate further reactive oxygen species via respiratory burst enzymes (NADPH oxidase and myeloperoxidase) as well as those involved in prostaglandin and leukotriene metabolism [12]. In addition, the intestine is constantly exposed to various luminal oxidants originating from ingested

nutrients [13-15]. Key among these is the simultaneous consumption of iron salts and ascorbic acid, which can cause oxidative damage to biomolecules [16]. We therefore hypothesized that peroxidative attack directed against enterocyte brush-border membranes could lead to perturbations in intestinal transport. In previous studies, we demonstrated that iron or iron/ascorbate impair lipoprotein metabolism [17-19]. However, we could not conclude that the observed changes were provoked by iron-mediated lipid peroxidation, since antioxidants were not employed in these experiments to quench lipid peroxidation. The aim of the present experiments were to extend upon these observations (a) by comparing the potential of selected antioxidants to scavenge lipid peroxidation caused by iron/ascorbate; (b) by testing the effects of iron/ascorbate on lipid synthesis, apolipoprotein biogenesis as well as lipoprotein assembly and secretion; and (c) by evaluating the role of antioxidant buffering capacity to return the intracellular phase of lipid transport to normal.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Caco-2 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown at 37°C in Minimum Essential Medium (MEM; GIBCO-BRL, Grand Island, NY), containing 1% penicillin/streptomycin, 1% MEM nonessential amino acids (GIBCO-BRL), supplemented with 10% decompemented fetal bovine serum (FBS; Flow McLean, VA). Caco-2 cells (passages 30-40) were maintained with 5% CO₂ in T-75 cm² flasks (Corning, NY). Cultures were split (1:6) when they reached 70-90% confluence, using 0.05% trypsin-0.5 mM EDTA (GIBCO-BRL). For individual experiments, cells were plated at a density of 1 x 10⁶ cells/well on 24.5-mm polycarbonate Transwell filter inserts with 0.4-mm pores (Costar, Cambridge, MA), in MEM (as above), supplemented with 5% FBS. The inserts were placed into six-well culture plates, permitting separate access to the upper and lower compartments of the monolayers. Cultures were maintained for 20 days, a period at which we have observed that the cells are differentiated and suitable for studies on lipid synthesis [20,21]. The medium was refreshed every second day. Sucrase activity was assayed as a marker of cell differentiation and transepithelial resistance was measured as marker of monolayer integrity (Millipore, Bedford, MA) (20,21].

Estimation of Lipid Peroxidation

Caco-2 cells were cultured in the presence or absence of Fe²⁺/ascorbate added to the medium in the apical compartment. Incubation periods were terminated with 0.2% butylated hydroxytoluene (2,6-Di-t-butyl-p-cresol, BHT, Sigma) in order to measure malondialdehyde (MDA) as an index of lipid peroxidation. The amount of free MDA formed during the reaction was determined by HPLC as we described previously (17). Proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate (Na₂WO₄) (Aldrich

Chemical Co.) solution. The protein-free supernatants were then reacted with an equivalent volume of 0.5% (W/V) thiobarbituric acid solution (TBA, Sigma) at 90°C for 30 min. After cooling to room temperature, the pink chromogene [(TBA)₂-MDA] was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a KH₂PO₄/methanol mobile phase (70:30, pH 7.0) before MDA detection by HPLC.

Effect of antioxidants

In order to determine whether lipid peroxidation was responsible for the alterations caused by iron/ascorbate, various antioxidants were added separately to the apical compartment for 1h before incubation with iron/ascorbate. The antioxidants tested were catalase (2-10 mg/ml), mannitol (20-100 μM), tocopherol (200-1000 mM) and BHT (50-250 mM).

Measurement of Lipid Synthesis and Secretion

Caco-2 cell lipid synthesis and secretion were assayed as we described previously [21,22]. Briefly, radiolabeled [¹⁴C]oleic acid (sp act 53 mCi/mmol, Amersham, Oakville, ON, Canada) was added to unlabeled oleic acid and then solubilized in fatty acid-free bovine serum albumin [BSA; BSA/oleic acid 1:5 (mol:mol)]. The final oleic acid concentration was 0.7 mM (0.45 mCi)/well. Cells were first washed with PBS (Gibco) and the [¹⁴C]oleic acid-containing medium was added to the upper compartment. Fe²⁺/ascorbate (0.2 mM:2 mM) was added to the upper chamber in serum-free MEM. At the end of a 24-h incubation period, cells were washed, then scraped with a rubber policeman in a PBS solution containing anti-proteases (phenylmethylsulfonyl fluoride, pepstatin, EDTA, aminocaproic acid, chloramphenicol, leupeptin, glutathione, benzamidine, dithiothreitol, sodium azide, and trasylol, all at a final concentration of 1 mM). An aliquot was taken for lipid extraction by standard methods [23] in the

presence of unlabeled carrier phospholipids (PL), monoglycerides (MG), diglycerides (DG), triglycerides (TG), free fatty acids (FFA), free cholesterol (FC) and cholesteryl ester (CE).

The various lipid classes synthesized from [^{14}C]oleic acid were then separated by thin-layer chromatography (TLC) using the solvent mixture: hexane-ether-acetic acid (80:20:3, vol/vol/vol) as previously described [23,24]. The area corresponding to each lipid was scratched off the TLC plates, and the silica powder was placed in a scintillation vial with Ready Safe counting fluid (Beckman, Fullerton, CA). Radioactivity was then measured by scintillation counting (Beckman LS 5000 TD, ON, Canada). Cell protein was quantified by the Bradford method, and results were expressed as disintegrations per minute (dpm) per milligram of cell protein. Lipid secreted in the basolateral compartment was analyzed and quantified, as above, after centrifugation (2,000 revolutions/min, 30 min 4°C) to remove cell debris.

Cholesterol biogenesis was evaluated employing [^{14}C]-acetate as a precursor (53.9 Ci/mmol) after a 24-h incubation period as described previously [25,26]. Separation of free cholesterol and cholesteryl ester was performed by TLC.

Lipid Carrier

Blood was drawn 2 h after the oral intake of a fat meal by human volunteers and postprandial plasma was prepared to serve as a carrier for the lipoproteins synthesized by Caco-2 cells. The triglyceride-enriched plasma was incubated at 55°C for 1 h to inactivate enzymatic activity in the presence of antiproteases.

Isolation of Lipoproteins

For the determination of secreted lipoproteins, Caco-2 cells were incubated with the lipid substrate as above, in the presence or absence of Fe^{2+} /ascorbate and BHT.

The medium supplemented with anti-proteases (as above) was first mixed with a plasma lipid carrier (4:1, vol/vol) in order to efficiently isolate de novo lipoproteins synthesized. The lipoproteins were then isolated by sequential ultracentrifugation using a TL-100 ultracentrifuge (Beckman Instruments, Montreal, PQ, Canada) as described previously [23,24]. Briefly, chylomicrons were isolated following an ultracentrifugation (20,000 rpm, 20 min). VLDL (1.006 g/ml) and LDL (1.063 g/ml) were separated at 100,000 g for 2.26 h with a tabletop ultracentrifuge 100.4 rotor at 4°C. The HDL fraction was obtained by adjusting the LDL infranatant to density at 1.21 g/ml and centrifuging for 6.5 h at 100,000 g. Each lipoprotein fraction was exhaustively dialyzed (24 h) against 0.15 M NaCl and 0.001 M EDTA, pH 7.0 at 4°C.

De Novo Apolipoprotein Synthesis

The effect of Fe²⁺/ascorbate and BHT on newly synthesized and secreted apolipoproteins A-I, A-IV, B-48, B-100 and E was assessed as we previously described [27]. In order to first induce apo synthesis, cells were incubated apically with unlabeled oleic acid bound to albumin in serum-free medium, for 24 h prior to [³⁵S]methionine incubation. The concentration of the unlabeled lipid was equivalent to the labeled substrate described above. During this time, Fe²⁺/ascorbate and BHT were again added to the apical chamber. After a 24-h incubation period cells as well as the outer chambers were rinsed twice with PBS. The apical compartment was replaced with 1.5 ml of methionine-free medium containing the unlabeled substrate and [³⁵S]methionine (100 pCi/ml) (Amersham Life Sciences, 50 mCi/mmol). After a 3 h incubation period at 37°C with 5% CO₂, the medium was collected from the basolateral compartment. Cells were scraped off the inserts in cell lysis buffer, as above. The medium and the cell lysates were supplemented with the antiprotease cocktail. In order to assay detectable amounts of de novo apolipoprotein synthesis, the material from two wells was pooled.

Immunoprecipitation of Apolipoproteins

The medium and the cell lysate were first supplemented with unlabeled methionine to act as a carrier (final concentration 0.1 mM). Immunoprecipitation was performed in the presence of excess polyclonal antibodies to human apolipoproteins (Boehringer Mannheim, Germany) at 4°C overnight [27,28]. Samples were then washed with Nonidet (0.05%). They were subsequently centrifuged and resuspended in sample buffer (1.2% SDS, 12% glycerol, 60 mM Tris, pH 7.3, 1.2% betamercaptoethanol, and 0.003% bromophenol blue) and analyzed by a linear 4-15% polyacrylamide gradient preceded by a 3% stacking gel, as described previously [26-28]. Radioactive molecular weight standards (Amersham Life Sciences) were run at the same conditions. Gels were sectioned into 2-mm slices and counted after an overnight incubation with 1 ml of BTS-450 (Beckman) and 10 ml of liquid scintillation fluid (Ready Organic, Beckman). Results for each apo studied were expressed as dpm/mg protein to assess the specific effect of Fe²⁺/ascorbate and BHT on apolipoprotein synthesis and secretion.

Preparation of Microsomes

Microsome fractions were prepared as previously described [25]. Briefly, Caco-2 cells were incubated with Fe²⁺/ascorbate and BHT for 24 h. The cells were then rinsed, homogenized, and centrifuged for 10 minutes at 10,000 g (4°C). The supernatant fraction was subsequently centrifuged for 60 minutes at 100,000 g (4°C). The washed microsomal pellets were quick-frozen and stored at -80°C for later assay.

Assay of Microsomal HMG-COA Reductase Activity

Microsomal enzymatic activity was assayed as described previously [17,25]. The reaction mixture was comprised of 100 mmol/L potassium phosphate (pH 7.4), 150 mg of microsomal protein, 20 mmol/L of glucose-6-phosphate, 12.5 mmol/L dithiothreitol, 2.5 mM NADP and 1.2 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase. The

reaction was initiated by the addition of [3-¹⁴C]-HMG-CoA (12,000 dpm/nmol). After incubation for 30 minutes at 37°C, the [¹⁴C]-mevalonate formed was converted into lactone, isolated by TLC, and counted using an internal standard to correct for incomplete recovery. HMG-CoA reductase activity was expressed as picomoles of mevalonate synthesized per milligram protein per minute. Protein content was measured according to Lowry [29].

Microsomal ACAT Activity

ACAT determination was performed as per our previous reports [17,25]. [¹⁴C]oleoyl coenzyme A (specific activity ~ 10,000 dpm/nmol) was added to the mixture containing 150 mg microsomal protein in a buffer solution (pH 7.5) consisting of cholesterol, 0.04 mol/L of KH₂PO₄, 50 mmol/L NaF, 0.25 mol/L of sucrose, and 1 mmol/L of ethylenediaminetetraacetic acid to initiate the reaction. After incubation for 10 minutes at 37°C, the reaction was stopped by adding chloroform/methanol (2:1, vol/vol). [³H]cholesteryl oleate was added as an internal standard to estimate recovery.

Measurement of L-fatty acid binding protein (L-FABP) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP)

After a 1 hour pre-incubation with 150 mM BHT in serum-free MEM (GIBCO-BRL), Caco-2 cells were supplemented with Fe²⁺/ascorbate for 24 hours. Cells were then washed twice with PBS (GIBCO-BRL) and scraped in 0.5 mL lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% sodium desoxycholate, 1% Triton, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM BHT and 1 mM pepstatin). Aliquots of cell homogenates were centrifuged for 10 min at 18,000 g. FABP and MTP levels were determined on the resulting supernatant by SDS-polyacrylamide gel and transfer on Hybond nitrocellulose membrane

(Amersham), followed by the detection of an enhanced chemiluminescence system of antigen-antibody complexes as described previously [30]. Polyclonal antibodies directed against L-FABP and MTP were kindly provided by Drs. W. Yotov and J. Wetterau.

Statistical Analysis

All values were expressed as the mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by two-tailed student's t-test.

RESULTS

Peroxidation and antioxidants

Lipid peroxidation was initiated when Caco-2 cells displayed differentiation, as assessed by sucrase activity (30 IU/g protein). Transepithelial electrical resistance (~3000 ohm x cm²) was used as a marker of monolayer integrity, indicating cell confluence as well as tight junction formation and interdigitations. The iron/ascorbate oxygen-radical generating system was used as a single source of free radicals and the degree of cellular lipid peroxidation was determined by measuring the amount of MDA formed during a 24-h culture period. As illustrated in Fig. 1, iron-ascorbate was able to induce a significant (5.2 fold greater, $p < 0.0001$) lipid peroxidation compared with control cells cultured without the peroxidant agent. The efficiency of various antioxidants to prevent or reduce lipid peroxidation induced by iron/ascorbate was then evaluated in a dose-dependent manner (Fig. 2). BHT suppressed cellular peroxidation at the concentrations of 150 μ M, whereas catalase, mannitol and tocopherol did not cause a similar decrease at all the concentrations tested (Fig. 2A). Since BHT maintains its cellular antioxidant activity near baseline values even at higher concentrations and was also efficient in the basolateral medium (Fig. 2B), it was selected for the subsequent experiments.

Lipid esterification

The administration of iron/ascorbate resulted in a consistent decrease in Caco-2 cell content of phospholipids and triglycerides without affecting cellular cholesteryl ester fraction (Fig. 3A). However, the addition of BHT to the apical compartment prevented the iron/ascorbate-mediated reduction in [¹⁴C]-oleic acid incorporation into these lipid classes. Besides, BHT exhibited little protection to normalize the abnormal basolateral lipid secretion caused by iron/ascorbate (Fig. 3B).

De novo cholesterol synthesis

The biogenesis of cholesterol was examined with [^{14}C]-acetate in the presence of iron/ascorbate alone or with the co-supplementation of BHT (Fig. 4). Iron/ascorbate induced an enhanced synthesis (Fig. 4A) and secretion (Fig. 4B) of free cholesterol and cholesteryl ester. The addition of BHT returned the synthesis and export values of cholesterol back to normal.

HMG-COA reductase and ACAT activities

In view of the alterations noted in the incorporation of [^{14}C]-acetate in cholesterol, we assessed the activity of the key enzymes, which regulate cholesterol synthesis and esterification. Iron/ascorbate caused an increase in HMG-COA reductase activity that returned to normal values with the addition of BHT to the culture medium (Fig. 5). Besides, ACAT activity remained insensitive to iron/ascorbate supplementation.

Apolipoprotein production

Experiments were performed in order to determine the effect of iron/ascorbate, with and without BHT on the ability of Caco-2 cells to produce apolipoproteins. When aliquots of immunoprecipitated [^{35}S]-methionine-labeled extracts were subjected to gel analysis, an abnormal profile of apolipoprotein biogenesis in response to iron/ascorbate was revealed (Fig. 6). Decreased amounts of cellular apo B-48, apo A-IV and apo A-I were observed compared to control wells. However, as shown in Fig. 6A, treatment of Caco-2 cells with iron/ascorbate in the presence of BHT showed that the cellular content of newly synthesized apolipoproteins was normal.

The analysis of radiolabeled apolipoproteins in the basolateral media of Caco-2 cell cultured with iron/ascorbate revealed decreased amounts of apo B-100, apo B-48 and apo A-IV (Fig. 6B). The addition of BHT restored the values of apo A-IV to normal,

partially corrected those for apo B-48, but was not effective in blocking the decline in apo B-100.

Lipoprotein formation

Experiments were also conducted to examine the role of iron/ascorbate with and without (BHT) in the transport of newly synthesized lipids by lipoproteins (Fig. 7). As anticipated from the lipid changes mentioned above, alterations in lipoprotein exocytosis were observed in the presence of iron/ascorbate. The secretion of chylomicrons, VLDL, LDL and HDL fractions decreased significantly. A trend toward normalization was observed in the presence of BHT (Fig. 7).

FABP and MTP

FABP is required for the binding and transport of fatty acids through the cytosol to the endoplasmic reticulum for lipid esterification [31]. MTP functions in the transfer of lipids from their site of synthesis in the endoplasmic reticulum membranes to apo B as it is synthesized and translocated across the endoplasmic reticulum [31]. Since these two proteins play a crucial role in lipoprotein assembly, we examined their modulation by iron/ascorbate in order to delineate their involvement in the abnormalities of lipid transport noted above. As illustrated in Fig. 8, no differences were observed in the protein mass of cellular FABP and MTP when Caco-2 cells were incubated with iron/ascorbate, with or without BHT.

DISCUSSION

Oxidative stress induces a wide spectrum of genetic, metabolic and cellular responses [1-7]. It can provoke damage to proteins, lipids, carbohydrates, and nucleic acids. Although the basic principles of iron-mediated lipid peroxidation are relatively well understood, their application to intestinal function raises a number of unresolved issues. Is intestinal fat absorption altered by iron, or iron-mediated lipid peroxidation? Do they exert distinct or specific effects on the sequential steps involved in intracellular lipid transport, i.e. lipid esterification and synthesis, apolipoprotein biogenesis, lipoprotein assembly and secretion? To answer these intriguing questions, we employed the Caco-2 cell line, an experimental model that has yielded much important information on intestinal lipid and lipoprotein metabolism [20,21,31]. Culture on filter inserts allows for the independent manipulation of the medium in apical and basolateral compartments [20,21,31]. The addition of iron/ascorbate to the apical compartment simulates delivery via the intestinal lumen, permitting the investigation of the effects of lipid peroxidation on cellular and basolateral synthesis of lipids, apolipoproteins and lipoproteins. We observed that the addition of the antioxidant BHT did not completely prevent or abolish the adverse effects of iron/ascorbate.

Several pathological alterations have been reported in patients with primary or secondary iron overload [6,7]. Cirrhosis, skin pigmentation, impaired cardiac function, arthropathy, diabetes mellitus, cancer and endocrinopathies are among the most serious adverse manifestations of iron overload [32-34]. Although the mechanisms remain obscure, it has been suggested that iron-catalysed free radical-mediated lipid peroxidation plays a significant role in the pathogenesis of those events [35,36]. Our findings demonstrate that intracellular fat transport, an important and unique function of the intestine, was impaired by iron/ascorbate.

In the current experiments, we employed iron/ascorbate, a well-established model for the induction of lipid peroxidation [19]. It initiates peroxidation, as demonstrated by the increased values of MDA, probably by producing highly reactive hydroxyl radicals from hydrogen peroxide via Fenton type reactions. An extensive literature documents the ability of Fe^{2+} /ascorbate to initiate marked lipid peroxidation in native and reconstituted biological membrane systems. Fe^{2+} can result in the formation of hydroxyl radical ($\text{OH}\bullet$), ferryl radical (Fe-OH^{3+}), perferryl ion, and an $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ complex maintaining O_2 as a bridging ligand. Ascorbic acid can amplify the oxidative potential of iron by promoting metal ion-induced lipid peroxidation [41,42]. In the experiments described herein, Fe^{2+} /ascorbate was very effective in inducing lipid peroxidation, as demonstrated by high MDA levels, a well-established measure of lipid peroxidation. Supporting evidence was provided by the scavenger activity of BHT as well as catalase, mannitol and α -tocopherol. BHT was selected as an antioxidant for the balance of the experiments, because it was observed to be a powerful agent inhibiting iron-mediated oxidative stress. BHT has long been widely used as an antioxidant to preserve and stabilize the freshness, nutritive value, flavour and colour of foods [43].

One of the main objectives of this study was to ascertain whether the impaired lipid transport was due to lipid peroxidation, rather than the direct result of iron. In addition to iron-catalyzed peroxidation, iron/ascorbate impaired lipid esterification, cholesterol synthesis and apolipoprotein production. Potential mechanisms involved in these changes include the direct effects of free radicals on the physical properties of the membrane of the endoplasmic reticulum. This is the site where HMG-CoA reductase (the key regulatory enzyme of cholesterol synthesis) and glycerol-3-phosphate acyltransferase (the rate-limiting enzyme in triglyceride esterification) are located, and where apolipoprotein production takes place. Our recent studies demonstrated that the

peroxidative reactions resulted in an alteration in the unsaturation/saturation ratio of hepatic membrane phospholipid fatty acids and microsomal membrane fluidity, which, in turn, influenced membrane enzyme activities [17-19]. It is well established that the continuity and structural integrity of biological membranes are essential to cellular homeostasis and functions [44,45]. We therefore believe that iron/ascorbate-mediated peroxidative changes in the polyunsaturated fatty acids of membrane phospholipids affected endoplasmic reticulum integrity, thereby resulting in abnormal lipid and apolipoprotein synthesis.

The antioxidant BHT did not fully restore the intracellular processes disturbed by Fe^{2+} /ascorbate. It is thus conceivable that alternative mechanisms participated in the enterocyte pathway derangements. A plausible mechanism might involve direct interaction with iron. Various proteins have been reported to be modified by transition metal ions, such as iron and copper [46-49].

In conclusion, our data demonstrate that iron/ascorbate alters Caco-2 cell function. The intracellular lipid transport was affected by lipid peroxidation since, in association with the high levels of MDA, there was a modification of lipid esterification, cholesterol synthesis, apolipoprotein biogenesis and lipoprotein production. However, the iron transition metal was also able to directly promote some derangements in the fat transport process. Defining the origin, size and mechanisms of the peroxidation in the intestinal lumen will provide clues as to its implication in inflammatory bowel diseases.

LEGENDS

Figure 1: Malondialdehyde (MDA) levels in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate. Caco-2 cells were incubated with iron/ascorbate (0.2 mM:2mM) for 24 h at 37°C. Lipid peroxidation was monitored by measuring MDA formation in cells (A) and its release into the apical media (B), as reported in Methods. Results are expressed as pmol/mg cell protein. Data are mean \pm SEM for 3 separate experiments.

* $p < 0.0001$.

Figure 2: Effects of various antioxidants on iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation in Caco-2 cells. Post-confluent Caco-2 cells were incubated for 1h with catalase (2-10 mg/ml), mannitol (20-100 μ M), tocopherol (200-1000 μ M) or BHT (50-250 μ M) for 24 h prior to the addition of iron/ascorbate (0.2 mM:2 mM). Cells (A) and media (B) were then treated in order to determine malondialdehyde (MDA) by HPLC, as described in Methods. Values are expressed as pmol/mg cell protein. Each data point represents mean \pm SEM for 2 different experiments.

Figure 3: Lipid content in Caco-2 cells and culture media following the administration of iron/ascorbate oxidant and BHT antioxidant. Caco-2 cells were incubated with [14 C]-oleic acid substrate for 24h in the presence or absence of iron/ascorbate (0.2 mM: 2mM) and BHT (150 μ M) in the apical compartment. Lipids of cell homogenates (A) and basolateral media (B) were then extracted with 2:1 (V/V) chloroform/methanol, separated by thin-layer chromatography, and quantified. Values are mean + SEM of 6 different experiments. Data are

expressed as dpm/mg cell protein. TG, triglycerides; PL, phospholipids; CE, cholesteryl esters.

^ap<0.03; ^bp<0.01; ^cp<0.005; ^dp<0.004; ^ep<0.002; ^fp<0.0002; ^gp<0.0001.

Figure 4: Caco-2 cell cholesterol synthesis following exposure to iron/ascorbate and BHT. Caco-2 cells were incubated with [¹⁴C]-acetate as a precursor for 24 h in the presence or absence of iron/ascorbate (0.2 mM: 2mM) and BHT (150 μM) in the apical compartment. Cells and basolateral media were treated as described in Methods in order to determine the *de novo* synthesis of free cholesterol (FC), cholesteryl ester (CE) and total cholesterol (TC). Values are means ± SEM of 6 different experiments. Data are expressed as dpm/mg cell protein.

^ap<0.04; ^bp<0.03; ^cp<0.001.

Figure 5: HMG-CoA reductase and ACAT activity. The effect of iron/ascorbate and BHT was tested on the enzymes HMG-COA reductase and ACAT in cultured Caco-2 cells as described in the legend of Fig. 4.

^ap<0.05.

Figure 6: Synthesis of apolipoproteins by Caco-2 cells following the administration of iron/ascorbate and BHT. Caco-2 cells were incubated with [³⁵S]-methionine and unlabeled oleic acid (to stimulate apolipoprotein biogenesis) in the presence or absence of iron/ascorbate (0.2 mM : 2mM) and BHT (150 μM) in the apical compartment for 20 h. At the end of the labelling period, cells were washed, homogenized, and centrifuged. Supernatants from cell homogenates (A) and basolateral media (B) were then reacted with excess antibodies for 18 h at 4°C to

precipitate specific apolipoproteins. After washing, immune complexes were analysed by linear 4-20% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Gels were sliced and counted for radioactivity. Values are mean \pm SEM for 3 separate experiments, expressed as dpm/mg cell protein.

^ap<0.05; ^bp<0.04; ^cp<0.03; ^dp<0.02; ^ep<0.005.

Figure 7: Lipoprotein secretion by Caco-2 cells following the administration of iron/ascorbate and BHT. Caco-2 cells were cultured in the presence of [¹⁴C]-oleic acid, with or without iron/ascorbate (0.2 mM : 2mM) and BHT (150 μ M). After a 24 h incubation period, lipoproteins from basolateral media were isolated by ultracentrifugation. CM, chylomicrons; VLDL, very-low-density lipoproteins; LDL, low-density lipoproteins; HDL, high-density lipoproteins. Values are the mean \pm SEM of 6 experiments and are expressed as dpm/cell protein. ^ap<0.005.

Figure 8: Caco-2 cell content of L-fatty acid binding protein (L-FABP) and microsomal triglyceride transfer protein (MTP) following the addition of iron/ascorbate and BHT. Caco-2 cells were incubated with unlabeled oleic acid for 24 h in the presence or absence of iron/ascorbate (0.2 mM : 2mM) and BHT (150 μ M) in the apical medium. Aliquots of cell homogenates were centrifuged. The levels of L-FABP (A) and MTP (B) were then determined on the resulting supernatants by SDS-polyacrylamide and transfer onto a nitrocellulose membrane, followed by the detection of an enhanced chemiluminescence system for antigen-antibody complexes. A total of 15 μ g and 50 μ g cell lysate protein was applied for the detection of L-FABP and MTP, respectively.

REFERENCES

- [1] Ames, B.N.; Shigenaga, M.K.; Hagen, T.N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:7915-7922; 1993.
- [2] Kehrer, J.P. Free radicals are mediators of tissue injury and disease. Crit. Rev. Toxicol. **23**:21-48; 1993.
- [3] Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Oxygen, toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. **219**:1-14; 1984.
- [4] Fridovich, I. Overview: Biological sources of O₂. Meth. Enzymol. **105**:59-70; 1984.
- [5] Ryan, T.P.; Aust, S.D. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. Crit. Rev. Toxicol. **22**:119-141; 1992.
- [6] Powell, L.W.; Bassett, M.L.; Halliday, J.W. Hemochromatosis: 1980 update. Gastroenterology **78**:375-381; 1980.
- [7] Bassett, M.L.; Halliday, J.W.; Powell, L.W. Genetic hemochromatosis. Semin. Liver Dis. **4**:217-227; 1984.
- [8] Martinez-Cayuela, M. Oxygen free radicals and human disease. Biochimie **77**:147-161; 1995.
- [9] Babbs, C.F. Oxygen radicals in ulcerative colitis. Free Rad. Biol. Med. **13**:169-181; 1992.
- [10] Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol. Rev. **59**:527-603; 1979.
- [11] Grisham, M.G.; Granger, D.N. Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. Dig. Dis. Sci. **33**:6S-15S; 1988.
- [12] Blake, D.R.; Allen, R.E.; Lunec, J. Free Radicals in biological systems - a review

oriented to inflammatory processes. *Br. Med. Bull.* **43**:371-385; 1987.

[13] Cross, C.E.; Halliwell, B.; Allen, A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* **1**:1328-1330; 1984.

[14] Grisham, M.B.; Von Ritter, C.; Snith, B.F.; LaMont, J.T.; Granger, D.N. Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. *Am. J. Physiol.* **253**:G93-G96; 1987.

[15] Parks, D.A.; Williams, T.K.; Beckman, J.S. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a re-evaluation. *Am. J. Physiol.* **254**:G768-G774; 1988.

[16] Buettner, G.R.; Jurkiewicz, B.A. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat. Res.* **145**:532-541; 1996.

[17] Brunet, S.; Thibault, L.; Delvin, E.; Yotov, W.; Bendayan, M.; Levy, E. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* **29**:1809-1817; 1999.

[18] Brunet, S.; Guertin, F.; Thibault, L.; Gavino, V.; Delvin, E.; Levy, E. Iron-salicylate complex induces peroxidation, alters hepatic lipid profile and affects plasma lipoprotein composition. *Atherosclerosis* **129**: 159-168; 1997.

[19] Brunet, S.; Thibault, L.; Lepage, G.; Seidman, E.G.; Dubé, N.; Levy, E. Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Rad. Biol. Med.* **28**:46-54; 000.

[20] Mehran, M.; Levy, E.; Gurbindo, C.; Bendayan, M.; Seidman, E.G. Lipid apolipoprotein and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **33**:118-128; 1997.

[21] Mehran, M.; Seidman, E.; Marchand, R.; Gurbindo, C.; Levy, E. Tumor necrosis factor- α inhibits lipids and lipoprotein transport by Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.*

269:G953-G960; 1995.

[22] Spalinger, J.H.; Seidman, E.G.; 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.* **275:**G652-G659; 1998.

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

[24] Loirdighi, N.; Ménard, D.; Levy, E. Insulin decreases chylomicron production in human fetal small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* **1175:**100-106; 1992.

[25] Levy, E.; Garofalo, C.; Rouleau, T.; Gavino, V.; Bendayan, M. Impact of essential fatty acid deficiency on hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* **23:**848-857; 1996.

[26] Loirdighi, N.; Ménard, D.; Delvin, E.; Levy, E. Selective effects of hydrocortisone on intestinal lipoprotein and apolipoprotein synthesis in the human fetus. *J. Cell. Biochem.* **66:**65-76; 1997.

[27] Levy, E.; Sinnett, D.; Thibault, L.; Nguyen, T.D.; Delvin, E.; Ménard, D. Insulin modulation of newly synthesized apolipoproteins B-100 and B-48 in human fetal intestine: gene expression and mRNA editing are not involved. *FEBS Letter* **393:**253-258; 1996.

[28] Levy, E.; Thibault, L.; Delvin, E.; Ménard, D. Apolipoprotein synthesis in human fetal intestine: regulation by epidermal growth factor. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **204:**1340-1345; 1994.

[29] Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randail, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193:**265-275; 1951.

[30] Stan, S.; Delvin, E.E.; Seidman, E.; Rouleau, T.; Steinmetz, A.; Bendayan, M.; Yotov, W.; Levy, E. Modulation of apo A-IV transcript levels and synthesis by n-3, n-6,

and n-9 fatty acids in Caco-2 cells. *J. Cell. Biochem.* **75**:73-81; 1999.

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

[32] Gordeuk, V.R.; McLaren, G.D.; Samowitz, W. Etiologies, consequences and treatment of iron overload. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **31**:89-133; 1994.

[33] Friedman, S.L. The cellular basis of hepatic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **328**:1828-1835; 1993.

[34] McLaren, G.D.; Muir, W.A.; Kiellermeier, R.W. Iron overload disorders: natural history, pathogenesis, diagnosis and therapy. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **19**:205-266; 1983.

[35] Bacon, B.R.; Tavill, A.S.; Brittenham, G.M.; Park, C.H.; Recknagel, R.O. Hepatic lipid peroxidation *in vivo* in rats with chronic iron overload. *J. Clin. Invest.* **71**:429-439; 1983.

[36] Bacon, B.R.; Britton, R.S. The pathology of hepatic iron overload: A free radical-mediated process? *Hepatology* **11**:127-137; 1990.

[37] Dujaja, P.K.; Brasitus, T.A. Inactivation of rat small intestinal brush-border membrane alkaline phosphatase by oxygen free radicals. *Gastroenterology* **105**:357-366; 1993.

[38] Thomas, P.D.; Poznansky, M.J. Lipid peroxidation inactivates rat liver microsomal glycerol-3-phosphate acyl transferase. *J. Biol. Chem.* **265**:2684-2691; 1990.

[39] Bidlack, W.R.; Tappel, A.L. Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipid* **8**:177-182; 1973.

[40] Jourdeuil, D.; Vaananen, P.; Meddings, J.B. Lipid peroxidation of the brush-

border membrane: membrane physical properties and glucose transport. *Am. J. Physiol.* **264**:G1009-G1015; 1993.

[41] Bachowski, G.J.; Thomas, J.P.; Girotti, A.W. Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photooxidized cell membranes: cholesterol product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids* **23**:580-586; 1988.

[42] Haenen, G.R.; Bast, A. Protection against lipid peroxidation by a microsomal glutathione-dependent labile factor. *FEBS Lett.* **159**:24-28; 1983.

[43] Williams, G.M.; Iatropoulos, M.J.; Whysner, J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food Chem. Toxicol.* **37**:1027-1038; 1999.

[44] Stubbs, C.D.; Smith, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta* **779**:89-137; 1984.

[45] Shinitzky, M. Membrane fluidity and cellular functions. In: Shinitzky, M., ed. *Physiology of membrane fluidity*. Boca Raton, FL, CRC, 1984:1-52.

[46] Taborsky, G. Oxidative modification of proteins in the presence of ferrous ion and air. Effect of ionic constituents of the reaction medium on the nature of the oxidation products. *Biochemistry* **12**:1341-1348; 1973.

[47] Samuni, A.; Chevion, M.; Czapski, G. Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J. Biol. Chem.* **256**:12632-12635; 1981.

[48] Kim, K.; Kim, I.H.; Lee, K.-Y.; Rhee, S.G.; Stadtman, E.R. The isolation and purification of a specific "protector" protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem.* **263**:4704-4711; 1988.

[49] Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Lipid peroxidation: a radical chain reaction. In:

Halliwell, B., ed. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1985:139-189.

Figure 1

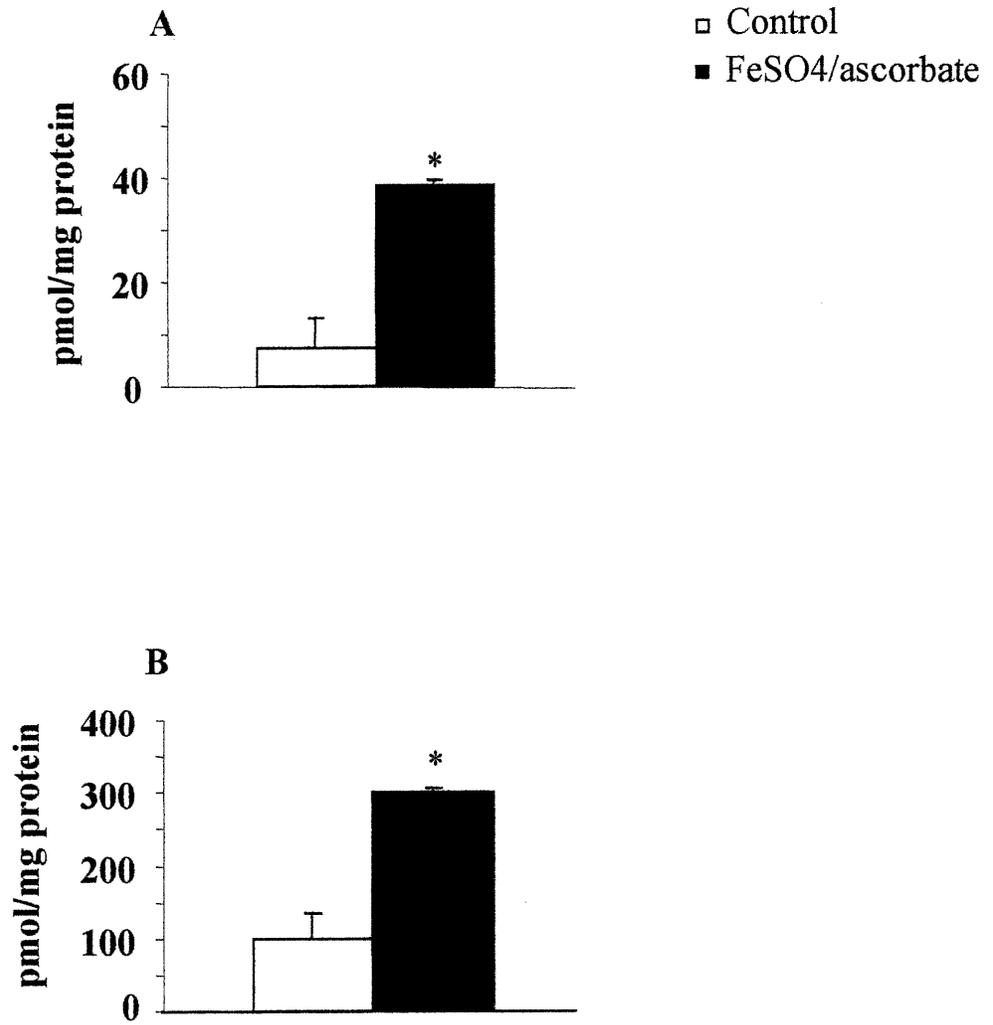


Figure 2A

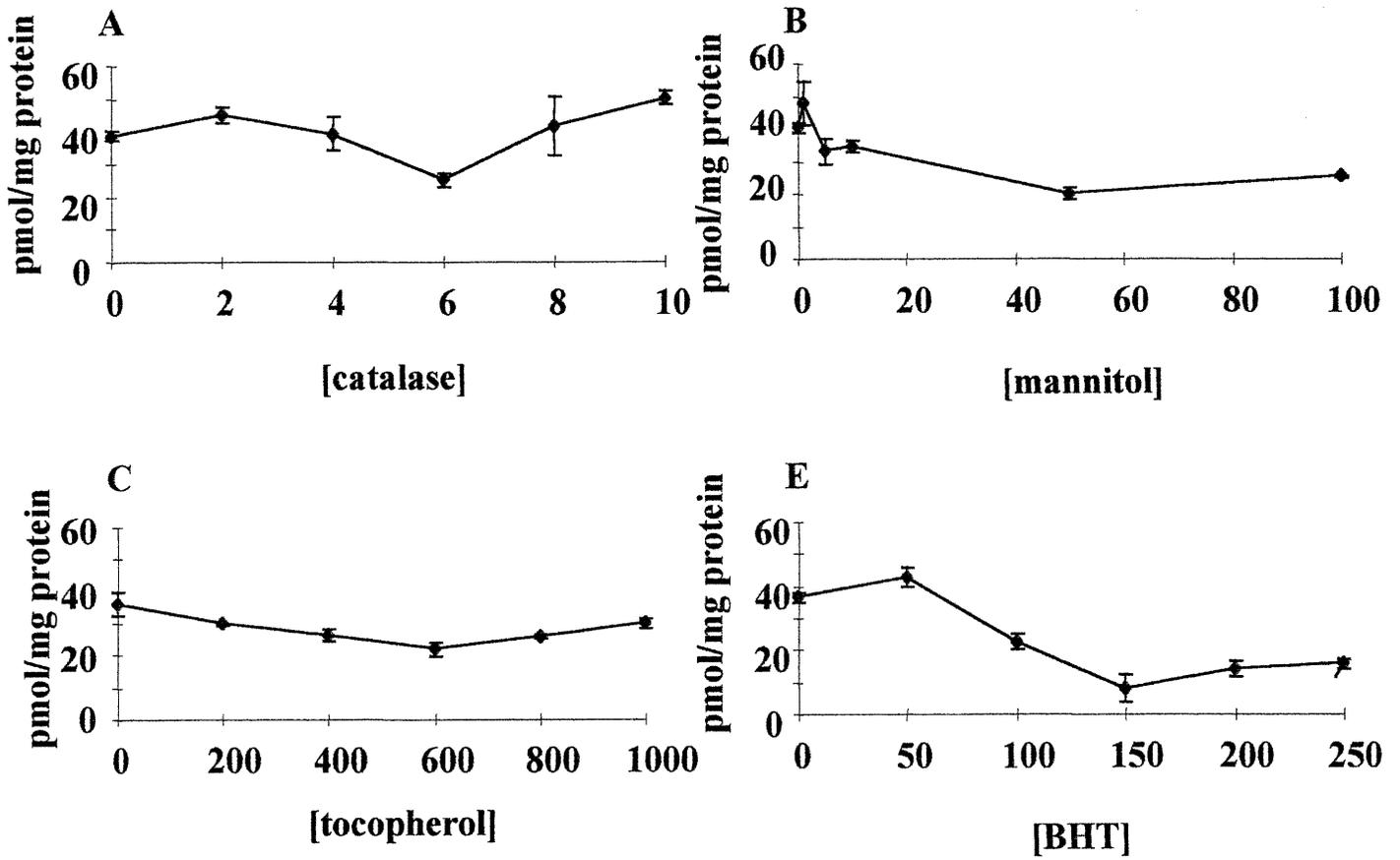


Figure 2 B

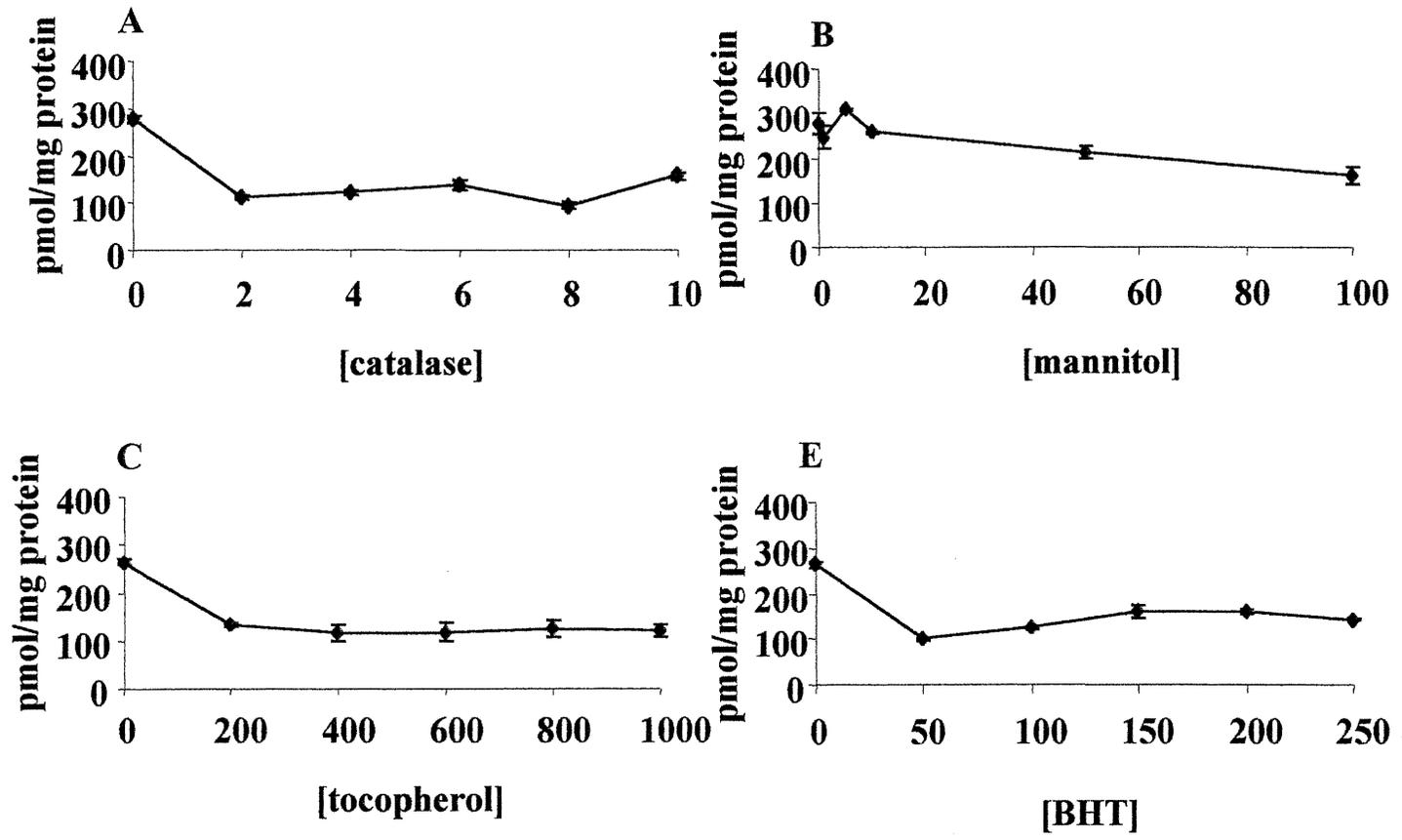


Figure 3

- Control
- ▨ BHT
- FeSO4/ascorbate
- ▤ FeSO4/ascorbate/BHT

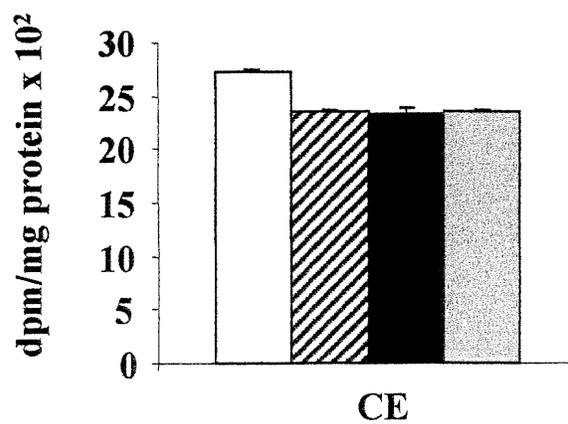
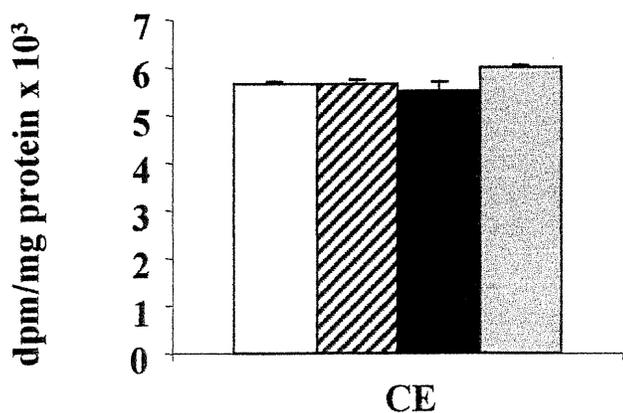
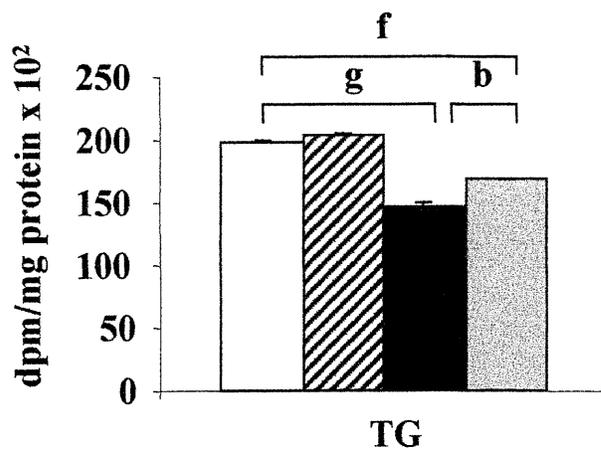
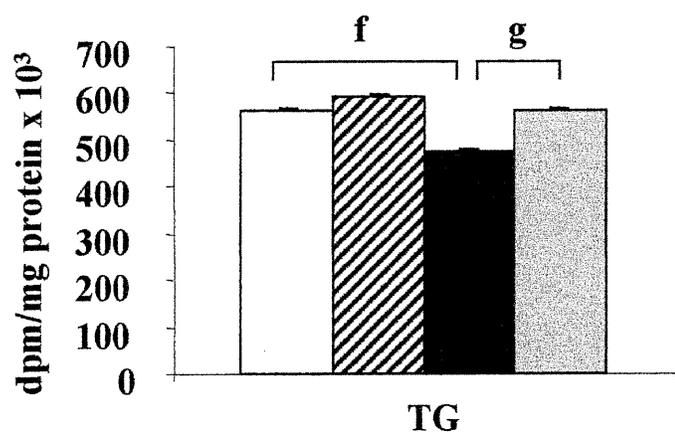
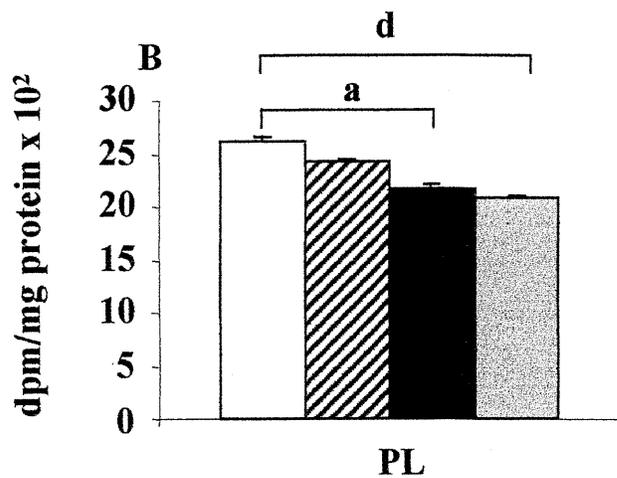
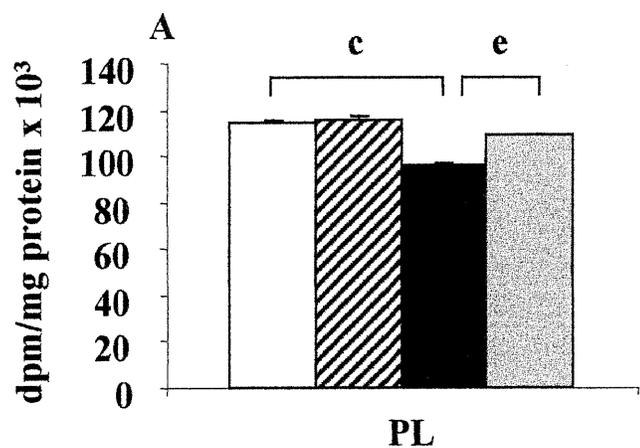


Figure 4

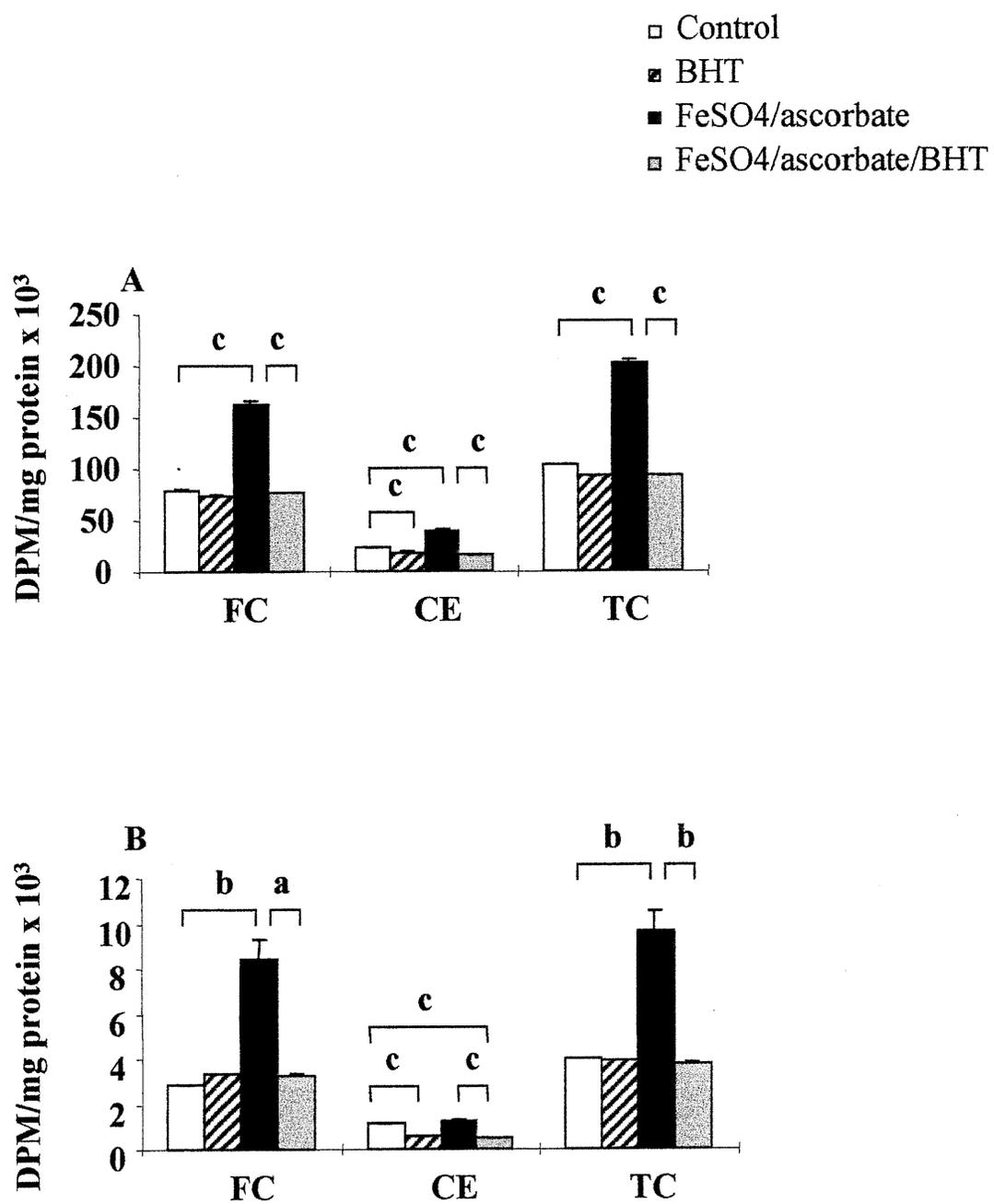


Figure 5

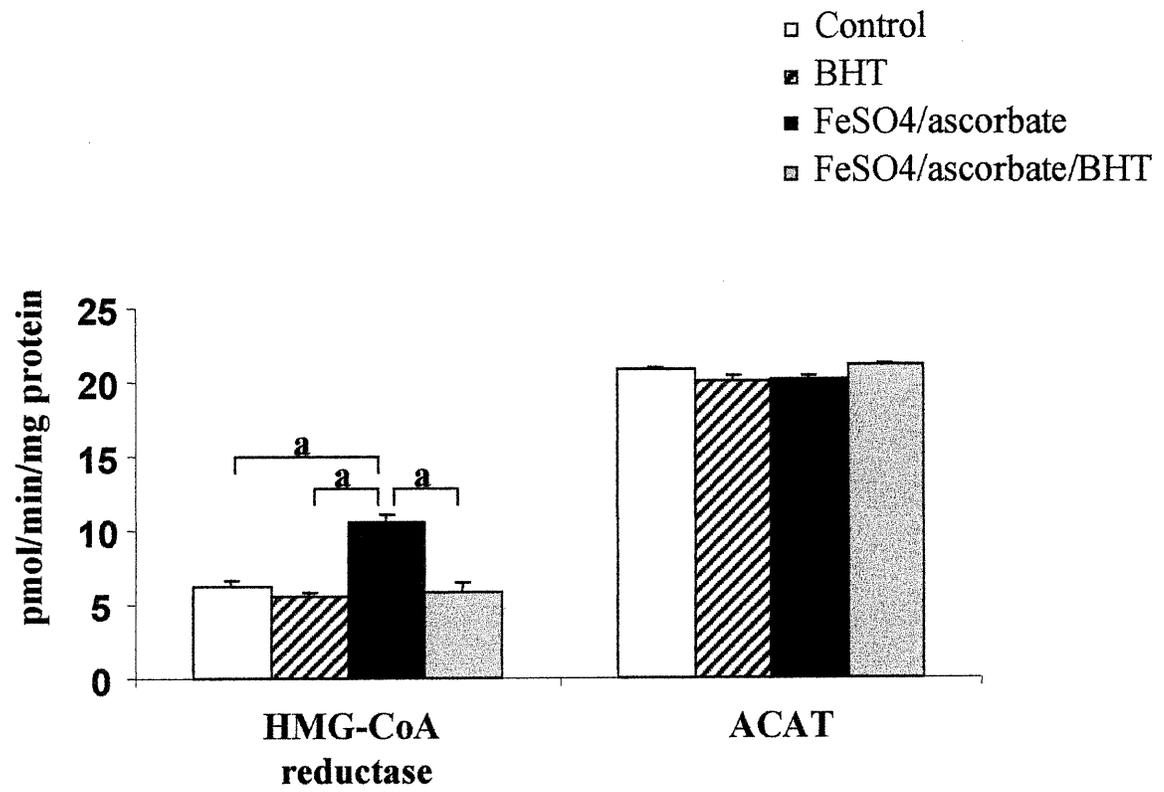


Figure 6

- Control
- ▨ BHT
- FeSO₄/ascorbate
- ▤ FeSO₄/ascorbate/BHT

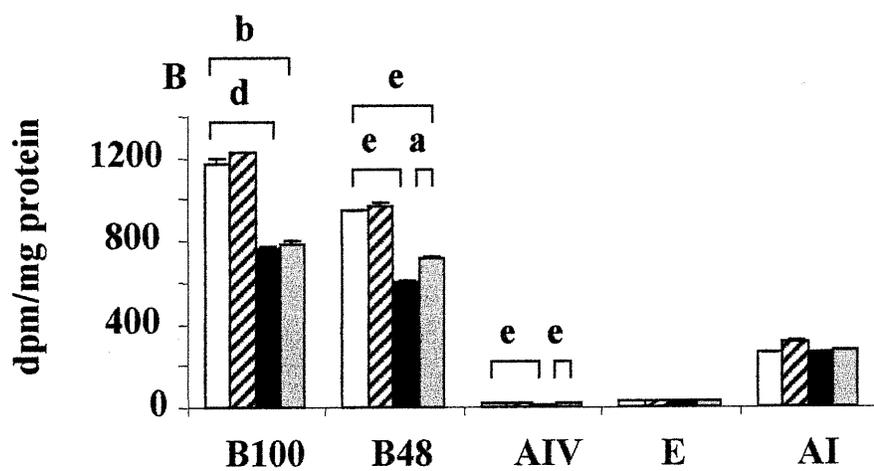
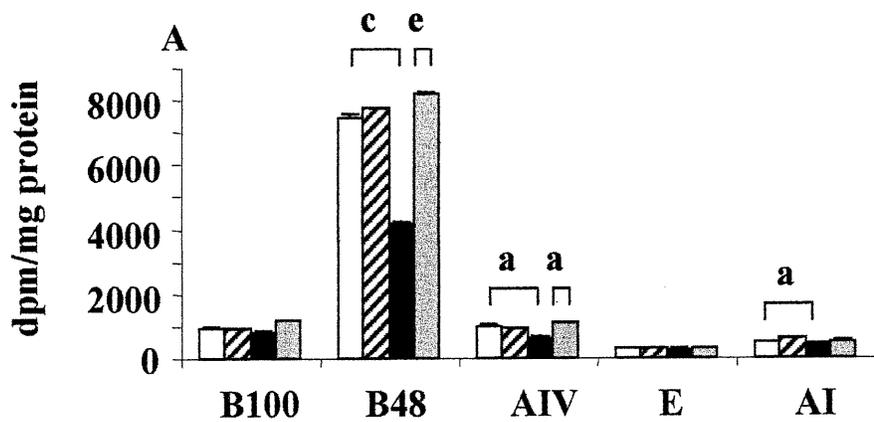
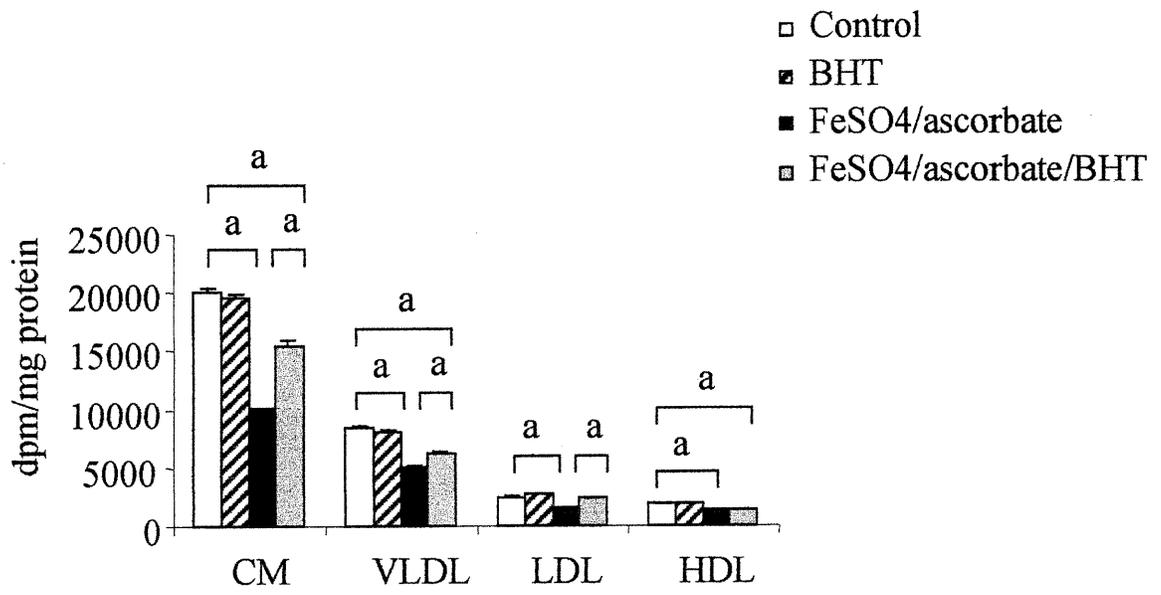


Figure 7



ARTICLE 3

**SYNERGISTIC EFFECTS OF BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE- AND
IRON/ASCORBATE-LIPID PEROXIDATION ON CACO-2 CELL INTEGRITY:
POSSIBLE ANTIOXYDANT ROLE OF BUTYRIC ACID**

(soumis dans Free Radical in Biology and Medicine, Janvier 2001)

Courtois F¹, Delvin E², Seidman E³, Bernotti S¹, Ledoux M¹, Levy E¹

Division of Gastroenterology and Nutrition, Centre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine

Departments of Nutrition¹, Biochemistry² and Pediatrics³, Université de Montréal,

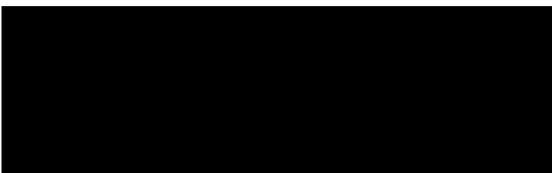
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

Keywords: Iron/ascorbate, membrane fluidity, permeability, cyclooxygenase-2, PGE₂

Short title: Lipid peroxidation and intestinal cell integrity

Address for correspondence:

Dr. Emile Levy
Division Gastroenterology and Nutrition
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Ste-Catherine Road
Montreal, Quebec H3T 1C5



ABSTRACT

Although an infectious etiology remains plausible, there is little information concerning the contribution of intestinal bacteria to lipid peroxidation in inflammatory bowel diseases. The aim of this study was, therefore, to examine the effects of lipopolysaccharide (LPS), the most endotoxin mediator of gram-negative bacteria, alone or in combination with iron/ascorbate on epithelial cell integrity. Furthermore, we assessed the antioxidant capacity of butyric acid, known to play a significant role in the welfare of intestinal mucosa. When differentiated Caco-2 cells were incubated with LPS, a dose-dependant increase in malondialdehyde was observed, which was accompanied by a slight decrease in apical membrane fluidity and sucrase activity. LPS also caused an enhancement of paracellular permeability tested by [¹⁴C]-polyethylene glycol flux, the production of prostaglandin E₂ and the expression of COX-2 protein. An exacerbation of these abnormalities was noted by the coadministration of LPS and iron/ascorbate. On the other hand, butyric acid reduced the cell alterations provoked by LPS and iron/ascorbate, while the treatment of Caco-2 cells with combined butyric acid and butylated hydroxytoluene (BHT) suppressed most of the perturbations. These results underline the role of LPS-mediated lipid peroxidation in Caco-2 cell integrity and stress the antioxidant protection provided by butyric acid. Moreover, the presence of bacterium endotoxin during inflammatory bowel disease and the consumption of prooxidant-containing foods, as reflected by the use of iron/ascorbate in our experiments, can overwhelm antioxidant defense and become deleterious to cellular biological processes and tissue functions.

INTRODUCTION

The lumen of the small intestine is lined with a single layer of epithelial cells, mainly comprised of absorptive columnar enterocytes. Aside from nutrient transport, the mucosal surface provides an intact functional barrier, protecting the host against diverse deleterious agents present within the gut lumen. In addition to the mechanical and chemical factors, the mucosal defense system is also equipped with an effective immunologic compartment (1). Together, these physico-chemical and immunologic factors confer protection against the normal commensal flora residing in the intestinal lumen as well as potential microbial pathogens. Intestinal cells are also capable of actively participating in the epithelial local immune response, with the expression of adhesion molecules important in the homing of T cells, the secretion of cytokines and the expression of cytokine receptors (2-7). Disruption of the host mucosal defense system can lead to bacterial translocation and inflammation, potentially contributing to chronic bowel disorders such as inflammatory bowel diseases (IBD) and multiple organ failure (8,9).

Abnormalities of the host mucosal defense system are thus thought to contribute to the pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis, representing the culmination of a cascade of aberrant events at the intestinal level (8). A growing body of evidence suggests that the aberrant immune response, leading to chronic inflammation in IBD involves local peroxidation and overproduction of pro-inflammatory cytokines and mediators (10). Of particular interest is the involvement of tissue damaging reactive oxygen metabolites in the inflammatory process (11,12). Oxygen radicals elicit

membrane destabilization, alterations in DNA, inactivation of proteolytic enzymes associated with the detoxification of reactive oxygen metabolites, and induction of oxidative stress via interaction with plasma and cell factors (11). The latter induce chemotactic factors/peptides which attract and activate immunocompetent cells to produce oxidant stress (11). The resulting chronic intestinal inflammation promotes an imbalance between oxidant and antioxidant mechanisms at the tissue level (12), at times compromising circulating antioxidant reserves (13).

Increased intestinal permeability and the enteric bacterial flora have been implicated in the pathogenesis of IBD (8,14). Bacterial lipopolysaccharide (LPS) has been implicated in facilitating microbial translocation by a mechanism involving physical perturbation of the gut mucosal barrier (15). The first aim of this study was therefore to examine the potential interaction between free radical induced lipid peroxidation and LPS, a ubiquitous endotoxin mediator of gram-negative bacteria (16), on the integrity of the gastrointestinal mucosa. We determined the effect of LPS on various enterocyte membrane functions and characteristics, including permeability, transepithelial electrical resistance, fluidity, lipid peroxidation and sucrase activity, utilizing Caco-2 cells. The direct involvement of lipid peroxidation in these membrane alterations was verified by using butylated hydroxytoluene (BHT), a powerful scavenger of reactive oxygen species.

The gastrointestinal mucosa is constantly exposed to luminal oxidants from ingested foods, desquamated cells and bacteria (17-19). Consequently, the second goal of the present investigation was thus to evaluate the combined effects of LPS and an additional source of lipid peroxidation on the aforementioned membrane parameters. To

this end, the iron/ascorbate model was used, given its effectiveness in promoting lipid peroxidation (20,21). The third purpose of these experiments was to determine whether short-chain fatty acids display antioxidant properties of potential benefit to enterocyte membranes. Short chain fatty acids derived from dairy products and anaerobic fermentation of carbohydrates by endogenous bacterial flora are key elements, in the maintenance of human mucosal health and have potential clinical benefits in the treatment of IBD (22). Butyric acid, a short chain fatty acid thought to play a significant role in the maintenance of mucosa health (23), was tested in its capacity to scavenge reactive oxygen species generated by LPS and or iron/ascorbate.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Caco-2 cells (American Type Culture Collection, Rockville, MD) were grown at 37°C in Minimum Essential Medium (MEM; GIBCO-BRL, Grand Island, NY), containing 1% penicillin/streptomycin, 1% MEM nonessential amino acids (GIBCO-BRL), supplemented with 10% decompemented fetal bovine serum (FBS; Flow McLean, VA). Caco-2 cells (passages 30-40) were maintained with 5% CO₂ in T-75 cm² flasks (Corning, NY). Cultures were split (1:6) when they reached 70-90% confluence, using 0.05% trypsin-0.5 mM EDTA (GIBCO-BRL). For individual experiments, cells were plated at a density of 1 x 10⁶ cells/well on 24.5-mm polycarbonate Transwell filter inserts with 0.4-µm pores (Costar, Cambridge, MA), in MEM (as above), supplemented with 5% FBS. The inserts were placed into six-well culture plates, permitting separate access to the upper and lower compartments of the monolayers. Cultures were maintained for 20 days, a period at which we have observed that the cells are differentiated and suitable for studies on enterocyte function, such as lipid synthesis and lipoprotein secretion (24, 25). The medium was refreshed every second day.

Estimation of Lipid Peroxidation

Caco-2 cells were cultured in the presence or absence of LPS, and Fe²⁺/ascorbate, added to the medium in the apical compartment. The amount of free malondialdehyde (MDA) formed during the reaction was determined by HPLC as we described previously (26). Proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate (Na₂WO₄) solution (Aldrich Chemical Co.). The protein-free supernatants were then reacted with an equivalent volume of 0.5% (W/V) thiobarbituric acid solution (TBA,

Sigma) at 90°C for 30 min. After cooling to room temperature, the pink chromogene [(TBA)₂-MDA] was extracted with 1-butanol and dried over a stream of nitrogen at 37°C. The dry extract was then resuspended in a KH₂PO₄/methanol mobile phase (70:30, pH 7.0) before MDA detection by HPLC.

Effect of antioxidants

In order to determine whether lipid peroxidation was responsible for the alterations caused by LPS or iron/ascorbate, BHT was added to the apical compartment for 1h before incubation with these factors. The efficiency of butyrate to prevent or reduce lipid peroxidation induced by iron/ascorbate or LPS was also tested following a preincubation with the cells for 24 h.

Caco-2 cell integrity and viability

Caco-2 cells integrity following exposure to LPS or Fe²⁺/ascorbate was assessed by determining various cellular parameters. Transepithelial electrical resistance was measured with a Millicell-ERS apparatus (Millipore Corp., Bradford, MA). Apical membrane sucrase activity was examined as we described previously (25, 27). [¹⁴C]-polyethylene glycol flux was evaluated after the addition of the labeled probe (1 μCi/well) to the apical compartment (28). Samples were thereafter mixed with Ready Safe Counting fluid (Beckman, Fullerton, CA) and radioactivity was quantified by scintillation counting (Beckman LS 5000 TD, ON, Canada). Cellular protein content was determined according to Lowry et al (29). Cell viability was assessed by trypan blue exclusion (30).

Brush border membrane isolation

Brush border membranes were purified from Caco-2 cell homogenates according to the method of Schmitz *et al* (31). Briefly, the culture medium was removed and the cells attached to filters were rinsed twice with PBS. The cells were then scraped off and homogenized in Tris-HCl mannitol (2 mM HCl, 50 mM mannitol, pH 7.0). Following the addition of 10 mM MgCl₂, the homogenates were centrifuged (7700 x g, 15 min, 4°C). The supernatants were subsequently centrifuged (20,000 x g, 30 min, 4°C) and the resulting pellets were used for the determination of fluidity.

Cell membrane fluidity

Aliquots of brush border membranes were diluted with 300 mM mannitol, 10 mM Tris-HEPES and 100 mM KCl (pH 7.5). Fluidity was estimated by the incorporation of the fluorescent probe 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene p-toluene-sulfonate, and measurement of polarization (26). The final molar probe-to-lipid ratio was 1:1000. Fluorescence was measured in a spectrofluorometer at 25°C with polarization filters parallel and perpendicular to the excitation beam. Excitation was at 360 nm and emission at 420 nm.

Prostaglandin E₂ determination

Caco-2 cells were preincubated with sodium butyrate and/or BHT and exposed to Fe²⁺/ascorbate and/or LPS. Cellular prostaglandin E₂ (PGE₂) was measured by ELISA (Neogen Corporation).

Immunoblot analysis of cyclooxygenase-2

Following the incubation with antioxidants and prooxidants, Caco-2 cells were washed twice with PBS (GIBCO-BRL) and scrapped in 0.5 ml lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5% sodium desoxycholate, 1% triton, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM BHT and 1 mM pepstatin) as described (32). Cells were sonicated and aliquots of cell homogenates were mixed with loading buffer (Bio-Rad). COX-2 levels were determined by SDS-polyacrylamide and transfer on Hybond nitrocellulose membrane (Amersham), followed by the detection of an enhanced chemiluminescence system of antigen-antibody complexes (33). Quantitation was carried out by densitometry using Scion Image (© Scion Corporation).

Statistical analysis

All values were expressed as the mean \pm SEM. Data were analyzed by the one-way ANOVA and the two-tailed student's t-test. A p value \leq 0.05 was considered significant.

RESULTS

Membrane lipid peroxidation

LPS serves as an adhesion agent, which facilitates the binding of bacteria to cell surfaces and the delivery of bacterial toxins. On the other hand, short-chain fatty acids are major by-products of anaerobic bacterium metabolism, which can diffuse across biological membranes (22). Thus, differentiated Caco-2 cells were used to study the induction of membrane peroxidation by LPS and the potential protective role of butyric acid. As shown in Fig. 1, the incubation of Caco-2 cells with varying concentrations of LPS for 24h promoted increased MDA content in the apical medium and Caco-2 cells. The exposure of Caco-2 cells to butyric acid did not alter MDA production. The combination of LPS (100 µg/ml) and iron/ascorbate (0.2 mM:2 mM), an established oxygen-radical generating system, augmented MDA level (Fig. 2). The addition of butyric acid diminished LPS/iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation, whereas the administration of BHT (200 µM) totally suppressed it.

Caco-2 cell functional integrity and viability

The effect of LPS on Caco-2 cell integrity and viability were assessed by monolayer transepithelial resistance, sucrase activity, protein content and trypan blue exclusion after an incubation period of 24h. As shown in Fig. 3, transepithelial resistance and protein content remained unchanged with increasing concentrations of LPS. Similarly, cell viability was unaffected by the addition of LPS (results not shown). Only sucrase activity was moderately, but significantly, decreased by LPS at concentrations ranging from 25 to 200 µg/ml. Treatment of Caco-2 cells with butyric acid only did not result in the alterations in any of these parameters (Fig. 3).

The combination of LPS and iron/ascorbate did not amplify the derangements observed with the administration of LPS alone, and butyrate displayed its ability to neutralize the decrease in sucrase elicited by LPS or LPS + iron ascorbate (Figure 4).

Membrane fluidity

Experiments were carried out to determine the effects of LPS, iron/ascorbate and butyric acid on membrane fluidity, which indicates the relative motional freedom of the lipid molecules in the membrane bilayer. To this end, fluidity was measured by the incorporation of the fluorescent probe DPH in isolated apical membranes of Caco-2 exposed to LPS, iron/ascorbate and/or butyric acid (Fig. 5). A trend towards a decrease was noted with LPS alone. Iron/ascorbate alone, or combined with LPS, significantly diminished membrane fluidity. Butyrate and BHT were able to restore fluidity values to control levels in the presence of LPS and iron/ascorbate.

Paracellular membrane permeability

The transport of [^{14}C]-polyethylene glycol is considered to be a sensitive tool to estimate paracellular permeability of the intestinal mucosa. In order to determine whether LPS or iron/ascorbate affects tight junctions, [^{14}C]-polyethylene glycol was added to the apical medium of Caco-2 cells. A slight, non-significant increase in [^{14}C]-polyethylene glycol, was observed in Caco-2 cells pre-treated with either LPS or iron/ascorbate (Fig. 6). The combination of these two components resulted in a significant rise in the permeation flux. This alteration declined with the administration of butyric acid, BHT or the mixture of butyric acid and BHT. These data suggest that tight junctions of Caco-2 cells treated with LPS and iron/ascorbate exert less resistance to penetrants diffusing via the paracellular shunt pathway.

PGE₂ production and cyclooxygenase protein expression

COX-2 is a highly regulated enzyme that catalyzes the production of prostaglandins under physiological and pathological conditions (34). As noted in Fig. 7, LPS and iron/ascorbate increased the amount of Caco-2 cell PGE₂. The most significant increase was obtained with the combination of LPS and iron/ascorbate. PGE₂ levels returned to normal with the coadministration of butyric acid and BHT. COX-2 protein expression was examined by Western blot (Fig. 8). Increase COX-2 levels were observed following the pre-incubation of Caco-2 cells with LPS, iron/ascorbate or the two prooxidants combined. Neither butyrate nor BHT alone diminished the high COX-2 protein levels normal following incubation of Caco-2 cells with LPS and iron/ascorbate. However, decrease in this COX-2 levels was noted with the coadministration of butyric acid and BHT.

DISCUSSION

The intestinal epithelium is a key component to the barrier between the myriad of toxins, microbes and antigens present in the lumen and the underlying gut mucosal immune system (1,2). The major purpose of the current set of experiments was to ascertain how microbial and peroxidative components alter intestinal epithelial cell barrier function. Following the exposure of Caco-2 cells to LPS or/and Fe²⁺/ascorbate, we observed marked changes in the level of MDA, membrane lipid fluidity, sucrase activity, and paracellular permeability. Furthermore, these agents were able to induce PGE₂ and cyclooxygenase-2 protein expression. Butyrate and BHT restored mucosal barrier function and the activity and protein expression of COX-2 to normal values.

Gram-negative bacterial species constitute the main source of endotoxin in the gut microflora (34). Luminal bacteria are able to deposit their toxic and proinflammatory components, such as LPS, a glycolipid derived from the outer membrane of gram negative bacteria, at the apical surface of intestinal epithelial cells. LPS is a potent stimulus for the host immune response via its capacity to induce the proinflammatory cytokine cascade. LPS characteristically activates neutrophils, monocytes and macrophages via CD14 membrane receptor (34). An increasing body of evidence points to the direct effect of LPS on intestinal epithelial cells, via toll-like receptors (35). LPS can induce cell proliferation (36), modulate energy metabolism (37) and increase the production of inflammatory cytokines by enterocytes (38). The results outlined in our report indicate that LPS induces lipid peroxidation and concomitantly alters enterocyte membrane lipid fluidity, paracellular permeability and sucrase activity. Accordingly, Zareie et al have recently described an *in vitro* model of inflammation in which co-

culture of confluent monolayers of human T84 intestinal epithelial cells with LPS-activated monocytes resulted in significant abnormalities in epithelial ion transport and barrier function (39). Since the antioxidant BHT prevented these effects in our experiments, it is reasonable to suggest that impairment of membrane integrity is caused by LPS-mediated lipid peroxidation. A potential mechanism might involve peroxidative attack on PUFA, thereby altering membrane phospholipid environment, which, in turn, may influence membrane function. Thus, no matter what the primary event might be in IBD, the driving oxidative force provided by luminal microorganisms may damage the intestinal mucosa by means of their products, such as LPS. The resulting breach of epithelial barrier function would facilitate the translocation of bacterial antigens and the production of proinflammatory mediators by the host mucosal cells.

An important issue addressed in the set of experiments described herein is whether luminal endotoxins released from bacteria belonging to the normal gut flora or from enteropathogenic microorganisms, interact with ingested prooxidants to amplify epithelial barrier perturbations. In order to address this issue, we chose Fe^{2+} /ascorbate as an inducer of lipid peroxidation. An extensive body of literature documents the ability of combined iron and ascorbate molecules to initiate substantial lipid peroxidation in native and reconstituted biological membrane systems. Our recent studies (20,21) demonstrated the oxidative potential of iron/ascorbate to modify the membrane compartment of enterocytes and hepatocytes, thereby impairing lipid transport and metabolism in these organs. In the present set of investigations, Fe^{2+} /ascorbate was very effective in inducing lipid peroxidation, as evidenced by the high levels of MDA observed, a commonly used indicator of lipid peroxidation. More importantly, it appeared from our experiments that

the pro-oxidant combination of LPS and Fe^{2+} /ascorbate caused synergistic derangements to membrane integrity. Our data suggests that clinical trials should be undertaken in IBD in order to interfere with the production of peroxidative stress in addition to reducing the overgrowth of microflora in the gut lumen by antibiotic treatment.

The therapeutic role of short-chain fatty acids in various intestinal disorders is still under evaluation. However, their use proved effective in diversion colitis, providing evidence that the shortage of intraluminal short-chain fatty acids is associated with longstanding inflammation (40,41). In keeping with this hypothesis, our findings indicate that butyrate may help overcome oxidative stress induced by LPS, avoiding injury to the gut. Additional studies are needed to elucidate the mechanisms involved in butyrate induced repair processes in view of the multiple actions of butyrate on the intestinal mucosa. Not only is butyrate considered a valuable nutritional compound, it also acts as a cofactor for the regulation of transcription proteins involved in gene expression, and interacts with G-proteins at the membrane-cytoplasm interface (42). Furthermore, butyrate has a marked trophic effect on normal colonic mucosa, stimulates epithelial proliferation through neural and hormonal mechanisms, increase mucosal weight, DNA content as well as crypt length in normal bowel. The opposite effects are induced in colonic neoplastic cell lines, with arrest of the cells in the G1 phase and inhibition of DNA synthesis.

COX exists as two isoenzymes, COX_1 and COX_2 . Compelling evidence suggests that COX_1 synthesizes prostaglandins that are involved in the regulation of normal cell activity, whereas COX_2 appears primarily to produce prostaglandins at sites of inflammation (43). The use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibits COX_2

activity. A closer examination further revealed that oxidative status correlated with the increased COX-derived prostanoid biosynthetic process (44). In the current study, we found that LPS enhanced COX-2 activity and protein levels, which was accompanied by increased amounts of MDA and abnormalities in membrane integrity. Interestingly, butyrate and BHT reduced lipid peroxidation and simultaneously suppressed the activity and protein mass of COX-2. Based on these data, one can suggest that the pro-oxidant and antioxidant effects of LPS and butyrate, respectively, may influence COX-2.

LEGENDS

Figure 1: Effect of LPS and butyric acid on intestinal epithelial cell lipid peroxidation. Differentiated Caco-2 cells were incubated with increasing concentrations of LPS or butyrate for 24h at 37°C. Lipid peroxidation was determined by measuring the formation of malondialdehyde (MDA) in Caco-2 cells (A) and in the apical medium (B). Results are mean \pm SEM for 3 different experiments, each carried out in triplicate.

Figure 2: Effect of butyric acid and BHT on LPS- and iron/ascorbate-induced intestinal epithelial cell lipid peroxidation. Differentiated Caco-2 cells were pre-incubated with butyric acid and/or BHT for 24h before the addition of LPS (100 μ g/ml) and iron/ascorbate (0.2 mM: 2mM) for a 24h period. Data shown in cells (A) and apical media (B) are mean malondialdehyde (MDA) \pm SEM for 3 different experiments, each carried out in triplicate.

^a p<0.05 vs controls ^c p<0.05 vs LPS ^e p<0.05 vs LPS + Fe/Asc

^b p<0.01 vs controls ^d p<0.01 vs LPS

Figure 3: Effect of LPS and butyric acid on transepithelial resistance, sucrase activity and protein concentrations in Caco-2 cells. LPS was added at different concentrations to the apical medium of differentiated Caco-2 cells for 24h at 37°C prior to measurement of the various parameters. Data shown for LPS (A) and butyrate (B) are mean \pm SEM for 3 different experiments. ^a p<0.05; ^b p<0.01 ; ^c p<0.001

Figure 4: Combined effect of LPS and iron/ascorbate on transepithelial resistance, sucrase activity and protein content in Caco-2 cells. LPS (100 µg/ml) and iron ascorbate (0.2 mM : 2 mM) were added to the apical medium of differentiated Caco-2 cells for 24 h at 37°C prior to measurement of the different parameters. Data shown are mean ± SEM for 3 different experiments.

^ap<0.05, vs control

Figure 5: Effects of LPS and iron/ascorbate on apical membrane fluidity. Differentiated Caco-2 cells were pretreated or not with butyric acid (2.5 mM) and BHT (200 µM) for 24h before the addition of LPS (100 µg/ml) and/or iron/ascorbate (0.2 mM: 2 mM) for 24h at 37°C. The cells were thereafter disrupted to prepare brush-border membrane vesicles for fluidity measurement, as described in Methods. Data shown are mean ± SEM for 3 different experiments.

^ap<0.02; ^bp<0.01; ^cp<0.001

Figure 6: Effects of LPS and iron/ascorbate on [¹⁴C]-polyethylene glycol permeation in intestinal epithelial cells. Differentiated Caco-2 cells were pretreated or not with butyric acid (2.5 mM) and/or BHT (200 µM) for 24h before incubation with [¹⁴C]-polyethylene glycol, in the presence or absence of LPS (100 µg/ml) and/or iron/ascorbate (0.2 mM: 2 mM) for 24h at 37°C. Data shown are mean ± SEM for 3 different experiments.

^ap<0.04 ; ^bp<0.01

Figure 7: Effect of LPS and iron/ascorbate on intestinal epithelial cell PGE₂ production. Caco-2 cells were pretreated or not with butyric acid (2.5 mM) and/or BHT (200 μM) for 24h before the addition of LPS (100 μg/ml) and/or iron/ascorbate (0.2 mM: 2mM) for 24h at 37°C. PGE₂ was measured by ELISA. Data shown are mean ± SEM for 3 different experiments.

^a p<0.04 ; ^b p<0.01 ; ^c p<0.0005

Figure 8: Effect of LPS and iron/ascorbate on intestinal epithelial cell PGE₂ production. Caco-2 cells were pretreated or not with butyric acid (2.5 mM) and/or BHT (200 μM) during 24h before the addition of LPS (100 μg/ml) and/or iron/ascorbate (0.2 mM: 2mM) for an additional 24h period at 37°C. COX-2 expression was analyzed by Western blot.

(1) control ; (2) FeSO₄/Ascorbate ; (3) LPS ; (4) FeSO₄/Ascorbate/LPS ; (5) butyrate ; (6) FeSO₄/Ascorbate/LPS/butyrate ; (7) butyrate/BHT ; (8) FeSO₄/Ascorbate/LPS/butyrate/BHT.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the Canadian Crohn's and Colitis Foundation and the Dairy Farmers of Canada, as well as Research Scholarship Awards from the FRSQ (EGS, EL) and the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (EGS). The authors thank Danielle St-Cyr Huot for typing the manuscript.

REFERENCES

1. DeWitt RC, Kudsk KA. The gut's role in metabolism, mucosal barrier function and gut immunology. *Infect Dis Clin North Am* 1999;13:465-
2. Dionne S, Ruemmele FR, Seidman EG. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: Role of cytokines and immune cell-enterocyte interactions, pp 41-57. In: *Inflammatory bowel diseases*. Bristan BR, Walker-Smith JA, eds. Nestlé Nutrition Workshop Series vol. 2. Karger, Switzerland, 1999.
3. Jobin C, Hellerbrand C, Licato LL, Brenner DA, Sartor RB. Mediation by NF-kappa B of cytokine induced expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in an intestinal epithelial cell line, a process blocked by proteasome inhibitors. *Gut* 1998;42:779-787.
4. Li XC, Jevnikar AM, Grant DR. Expression of functional ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules by an immortalized epithelial cell clone derived from the small intestine. *Cell Immunol* 1997;175:58-66.
5. Ruemmele FM, Dionne S, Levy E, Seidman EG. TNF alpha-induced IEC-6 cell apoptosis requires activation of ICE caspases whereas complete inhibition of the caspase cascade leads to necrotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:159-166.
6. Ruemmele FM, Dionne S, Levy E, Seidman EG. Dexamethasone inhibits IFN gamma-induced MHC class II expression of intestinal epithelial cells independently of the TGF-beta1 regulatory pathway. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:595-601.
7. Waterhouse CC, Stadnyk AW. Rapid expression of IL-1beta by intestinal epithelial cells in vitro. *Cell Immunol* 1999;193:1-8.

8. Papadakis KA, Targen SR. Current theories on the causes of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin Nutr Am* 1999;283-296.
9. Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996;20:411-417.
10. Ma TY. Intestinal epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease. *PSEBM* 1999;214:318-327.
11. Verspaget HW, Mulder TPJ, Van Der Sluys Veer A, Pena AS, Lamers CBHW. Reactive oxygen metabolites and colitis; a disturbed balance between damage and protection. *SJGE* 1991;26:44-51.
12. Buffinton GD, Doe WF. Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Rad Biol Med* 1995;19:911-918.
13. Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, Seidman E. Altered lipid profile, lipoprotein composition and oxidant/antioxidant status in pediatric Crohn's disease. *Am J Clin Nutr* 2000;71:807-815.
14. Sartor RB. Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:17-22.
15. Wells CL, Jechorek RP, Olmsted SB, Erlandsen SL. Effect of LPS on epithelial integrity and bacterial uptake in the polarized human enterocyte-like cell line Caco-2. *Circ Shock* 1993;40:276-288.
16. Parks DA. Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 1989;30:293-298.
17. Nourooz-Zadeh J, Appelquist L-A. Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: milk powder products. *J Food Sci* 1988;53:74-79.

18. Wahle KW, Hoffe PP, McIntosh G. Effects of storage and various intrinsic vitamin E concentrations on lipid oxidation in dried egg powders. *J Sci Food Agric* 1993;61:463-469.
19. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a re-evaluation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1988;254:G768-G774.
20. Courtois F, Suc I, Garofalo C, Ledoux M, Seidman E, Levy E. Iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation alters the efficiency of caco-2 cells to assemble and secrete lipoproteins. *Am J Physiol* 2000;279:G12-G19.
21. Brunet S, Thibault L, Lepage G, Seidman EG, Dubé N, Levy E. Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Rad Biol Med* 2000;28:46-54.
22. Mortensen PB, Clausen MR. Short-chain fatty acids in the human colon: Relation to gastrointestinal health and disease. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:132-148.
23. Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G, Kasper H. Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterol* 1992;103:51-56.
24. 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. *Amer J Physiol* 1998;275:G652-G659.
25. Mehran M, Levy E, Bendayan M, Seidman E. Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997;33:118-128.

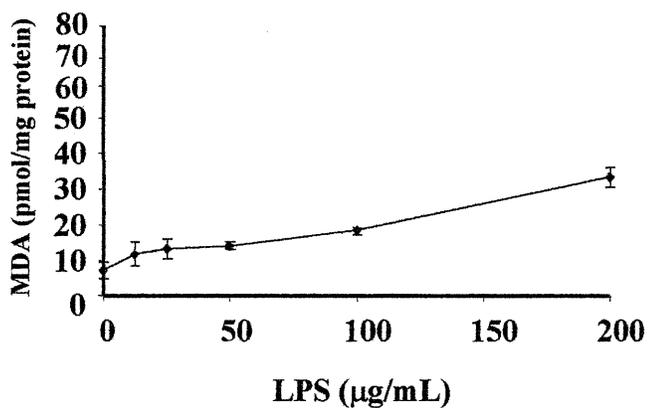
26. Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendant M, Levy E. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 1999;29:1809-1817.
27. Mehran M, Seidman E, Marchand R, Gurbindo C and Levy E. Tumor necrosis factor- α inhibits lipid and lipoprotein transport by Caco-2 cells. *Am J Physiol* 1995;269: G953-G960.
28. Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A, Holycross M. Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 1997;273:G812-G823.
29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
30. Baker SS, Baker RD Jr. Caco-2 cell metabolism of oxygen-derived radicals. *Dig Dis Sci* 1993;38:2273-2280.
31. Schmitz J, Preiser H, Maestracci D, Ghosh BK, Cerda JJ, Crane RK. Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim Biophys Acta* 1973;323:98-112.
32. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-3340.
33. Stan S, Delvin E, Rouleau T, Steinmetz A, Levy E. Modulation of apo A-IV transcript levels and synthesis by n-3, n-6 and n-9 fatty acids in Caco-2 cells. *J Cell Biochem* 1999;75:73-81.

34. Ulevitch RJ, Tobias PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr Opin Immunol* 1999;11:19-
35. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing toll-like receptors. *J Immunol* 2000;164:966-972.
36. Chakravorty D, Kumar KS. Modulation of barrier function of small intestinal epithelial cells by lamina propria fibroblasts in response to lipopolysaccharide: possible role of TNF alpha in inducing barrier dysfunction. *Microbiol Immunol* 1999;43:527-533.
37. Fujushima K, Sasaki I, Takahashi K, Naito H, Matsuno S. Lipopolysaccharide- and proinflammatory cytokine-induced energy production in intestinal and colonic epithelial cell lines. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:291-296.
38. Ogle CK, Guo X, Hasselgren PO, Ogle JD, Alexander JW. The gut as a source of inflammatory cytokines after stimulation with endotoxin. *Eur J Surg* 1997;163:45-51.
39. Zareie M, McKay DM, Kovarik GG, Perdue MH. Monocyte/macrophages evoke epithelial dysfunction: indirect role of tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol* 1998;275:C932-C939.
40. Scheppach W, German-Australian SCFA study group. Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. *Dig Dis Sci* 1996;41:2254-2259.
41. Tonelli F, Dolara P, Batignani G, Monaci I, Caderni G, Spagnesi MT, Luceri C, Amorosi A. Effects of short chain fatty acids on mucosal proliferation and inflammation of ileal pouches in patients with ulcerative colitis and familial polyposis. *Dis Colon Rectum* 1995;38:974-978.

42. Velzquez OC, Ederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig Dis Sci* 1996;41:727-739.
43. Crofford LJ, Lipsky PE, Brooks P, Abramson SB, Simmon LS, van de Putte LB. Basic biology and clinical application of specific cyclooxygenase-2 inhibitors. *Arthritis Rheum* 2000;43:4-13.
44. Kim H, Kim K, Yu B, Chung H. The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression. NF-kappaB activates IkappaBalpha degradation. *Free Radic Biol Med* 2000;28:683-692.

Figure 1 27

A. Cells



B. Medium

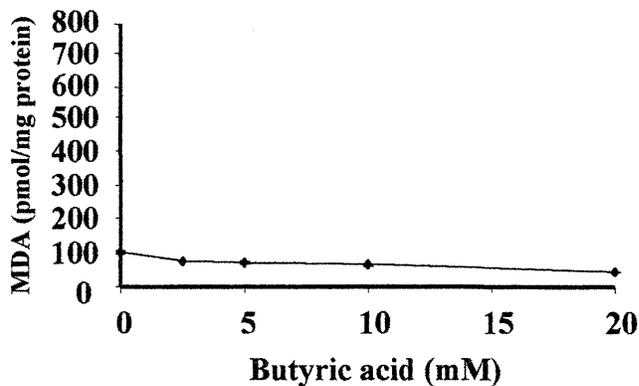
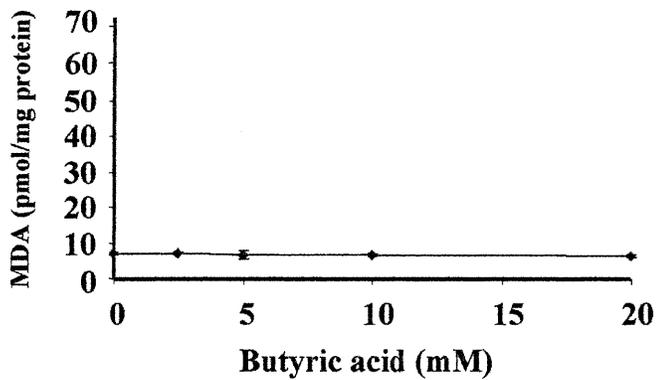
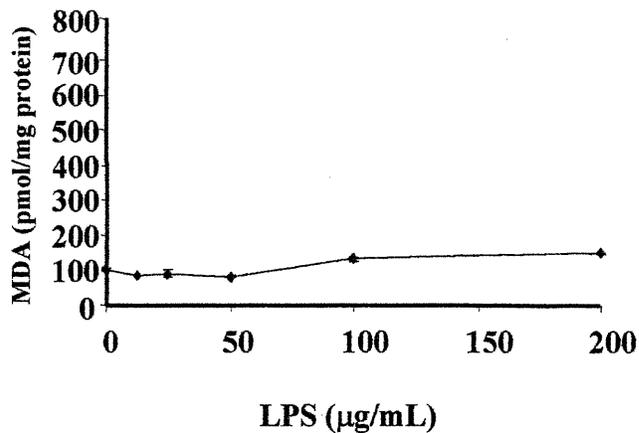


Figure 2 28

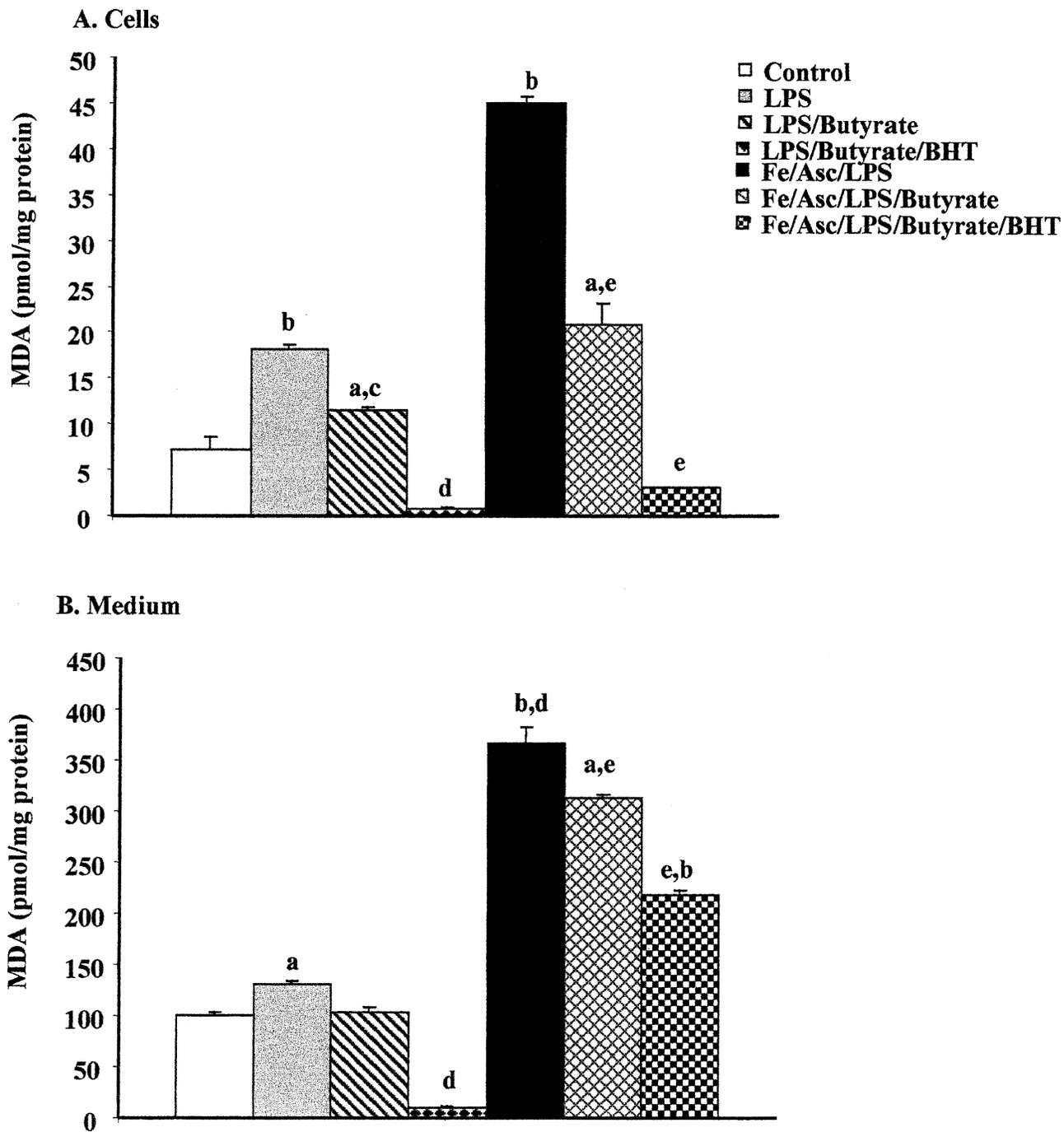


Figure 3

A. LPS

B. Butyric acid

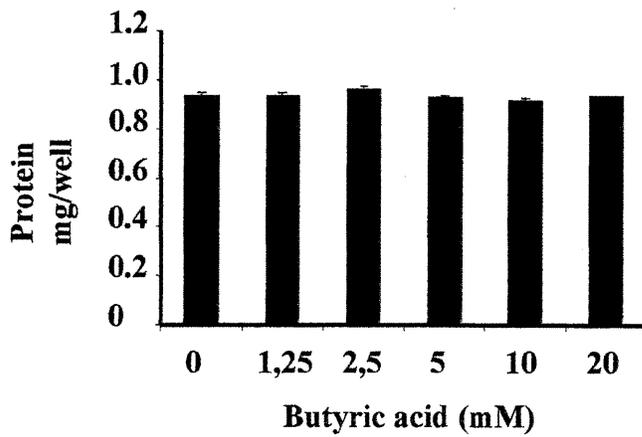
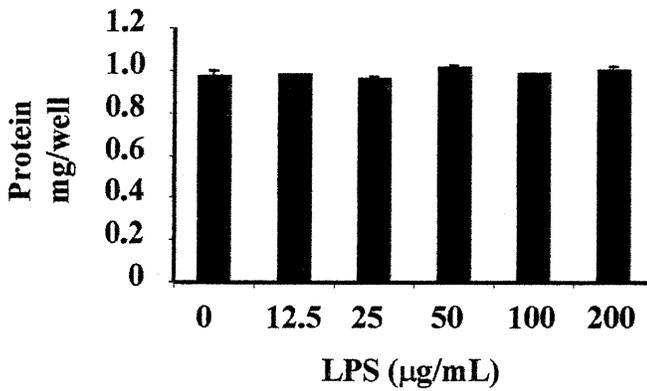
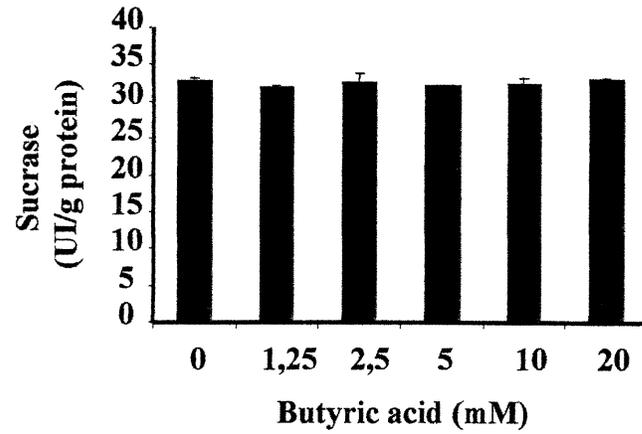
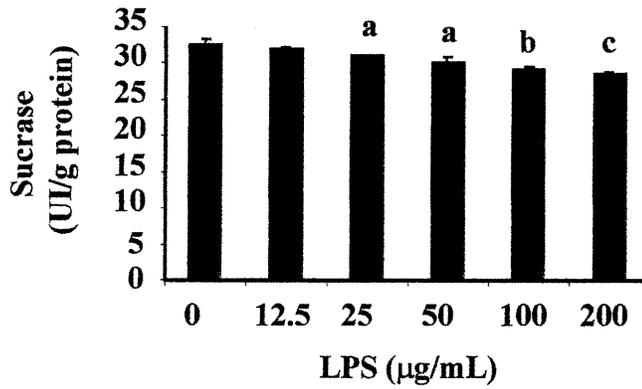
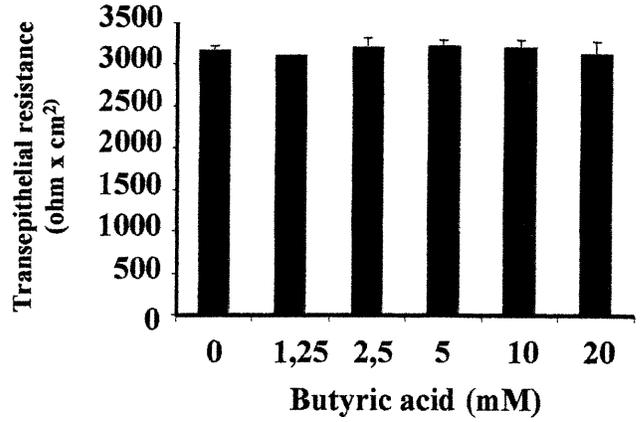
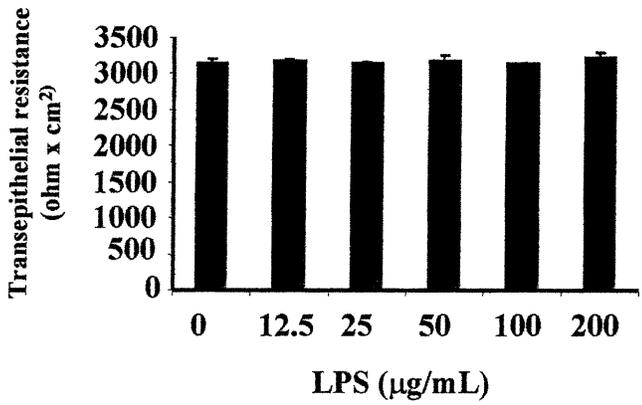
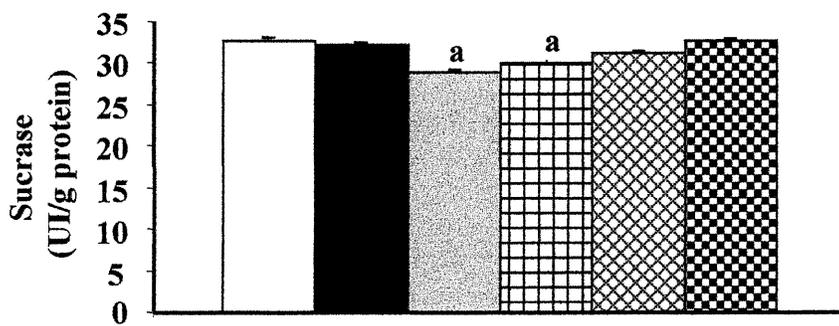
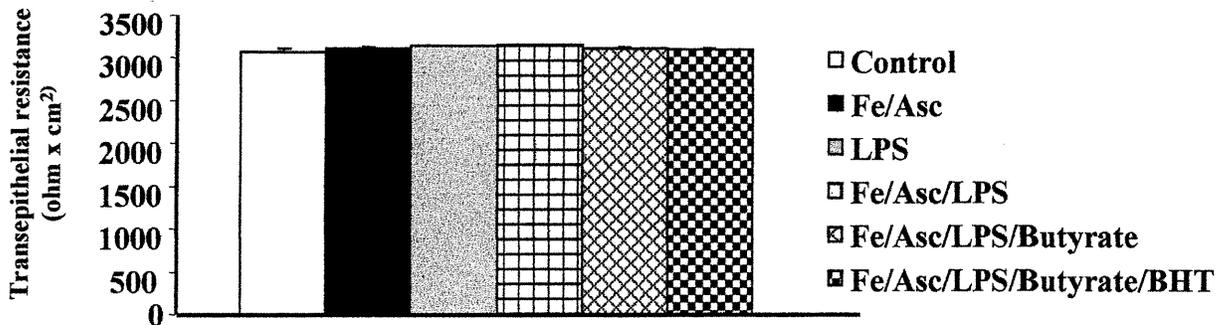
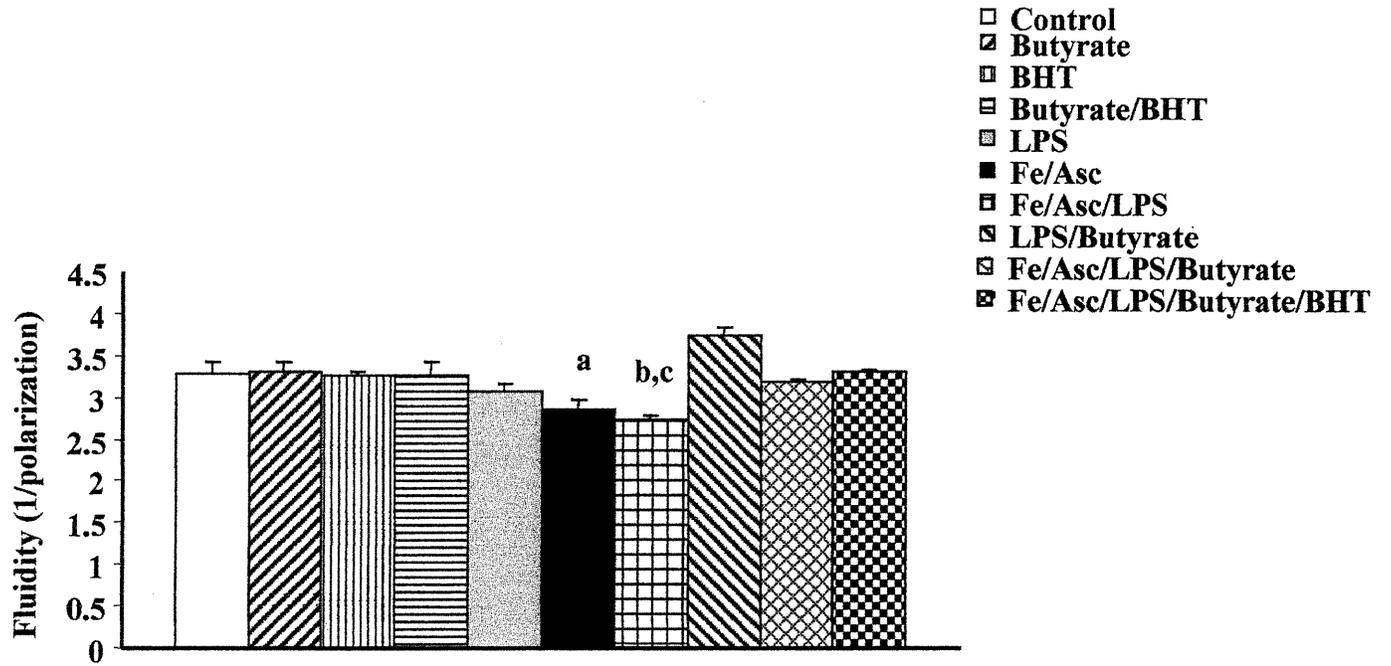


Figure 4 30





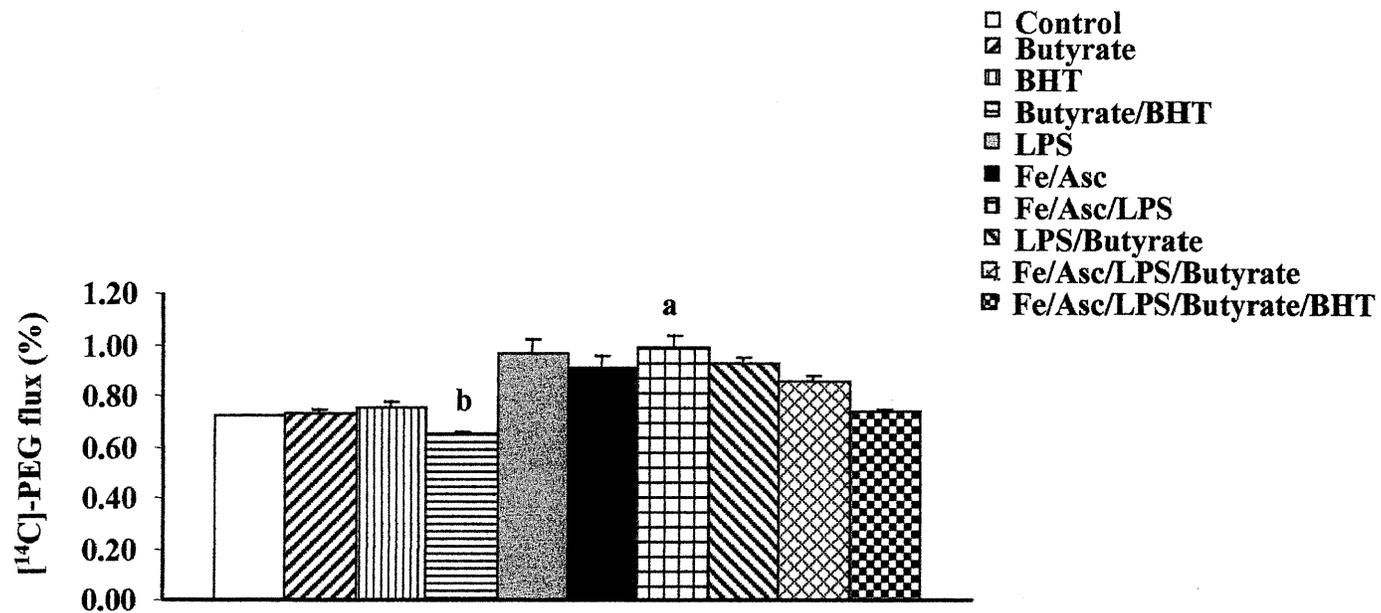


Figure 7 33

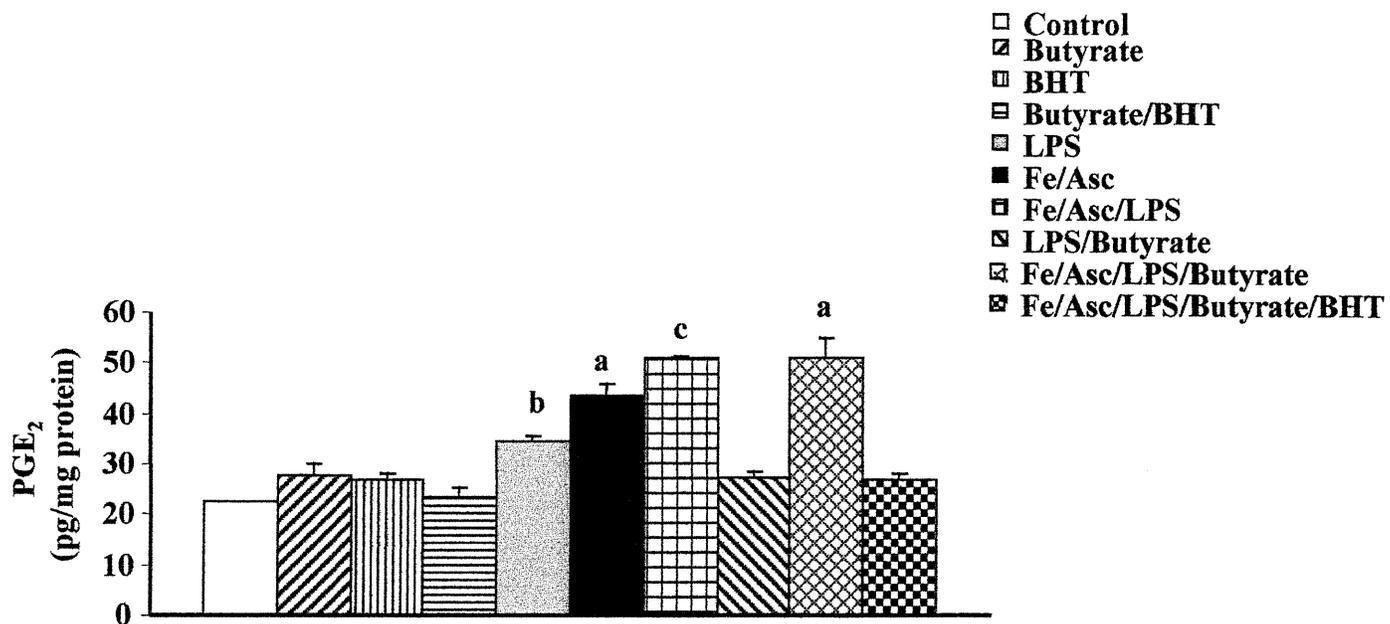
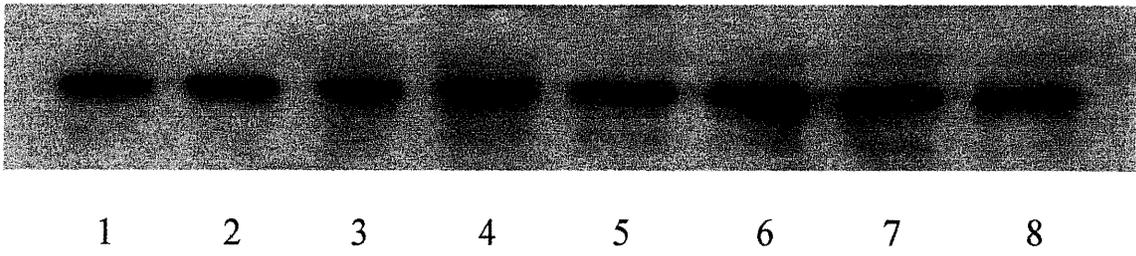


Figure 8 34



DISCUSSION

Le stress oxydant passionne de plus en plus la communauté scientifique depuis que l'on observe son implication dans de nombreuses pathologies affectant des organes variés. L'intestin n'est pas épargné par ce phénomène. Si c'est un épithélium dont l'un des rôles est d'assurer une barrière sélective contre les agents étrangers indésirables pour l'organisme, il est par contre soumis de façon continue à un stress oxydant. L'homéostasie est maintenue par l'action des antioxydants exogènes et endogènes. Cependant, il existe des situations pathologiques où le stress oxydant excède les capacités antioxydantes de l'intestin grêle, comme cela est le cas dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Nous avons donc assumé que les fonctions normales de l'intestin (absorption, défense contre l'invasion bactérienne, ...) sont alors perturbées. En fait, nous réalisons que même si de nombreuses études portent sur la viabilité cellulaire (Aw 1994, Aw *et al.* 1992 a et b, Bielefeldt *et al.* 1997, Jourd'heuil *et al.* 1993, LeGrand *et al.* 1998, Mehta *et al.* 1999, Murthy *et al.* 1998, Staprans *et al.* 1994), mettant en évidence la cascade d'événements provoquant l'apoptose ou la mort cellulaire, peu d'emphase à ce jour a été placée sur la fonction d'absorption des nutriments par les entérocytes suite à un stress oxydant.

Nous avons donc décidé d'étudier les effets de la peroxydation lipidique induite par le modèle du fer/ascorbate sur le métabolisme des lipides au niveau entérocytaire. Pourquoi utiliser le fer comme pro-oxydant ? Est-ce applicable à une pathologie intestinale où l'on peut observer des niveaux de stress oxydant élevés, comme les maladies inflammatoires de l'intestin ? Le fer ferreux permet la formation du radical hydroxyl à partir de peroxyde d'hydrogène. Dans l'organisme humain, le fer est généralement lié et ne peut donc participer à des réactions conduisant à une production de radicaux libres. Néanmoins, il peut se retrouver à l'état libre lors de desquamation cellulaire, d'apports excessifs par l'alimentation, et de processus d'inflammation. Dans les cas de maladies inflammatoires de l'intestin, l'absorption de fer est diminuée, augmentant ainsi la concentration de fer alimentaire dans la lumière intestinale (Babbs 1992). Il peut également y avoir des saignements intestinaux, augmentant ainsi la concentration de fer dans la lumière (Babbs 1992). L'utilisation du fer s'applique donc tout à fait à la réalité pathologique, et n'est pas un modèle purement théorique. De plus, dans cette étude, nous nous trouvons dans la fourchette de concentrations physiologiques

en fer. En effet, on considère que 10 à 15 mg de fer alimentaire, selon le sexe, sont ingérés quotidiennement. Cela correspond à 10 à 15 % de fer héminique, et à 85 à 90 % de fer non-héminique. De 20 à 25 % du fer héminique et environ 5 % du fer non-héminique sont absorbés au niveau de l'intestin (Shils *et al.* 1994). Ainsi, 0,8 à 1,2 mg de fer héminique et 8,1 à 12,2 mg de fer non-héminique, soit au total 8,9 mg à 13,4 mg de fer se retrouvent dans la lumière intestinale après absorption. Le volume du bol alimentaire peut varier de 0,5 à 5 L par jour. Sachant que le poids moléculaire du fer est 56 g/mol (ou mg/mmol). La concentration de fer présente dans la lumière de l'intestin peut varier de 0,030 mmol/L à 0,480 mmol/L quotidiennement. Le modèle FeSO_4 , 0,200 mM, utilisé dans cette étude est donc tout à fait comparable à ce que l'on peut observer physiologiquement.

Pour obtenir un modèle pro-oxydant, l'utilisation de l'acide ascorbique est particulièrement importante. Hoepelman *et al.* (1989) ont démontré que parmi toutes les formes de fer administrées (sulfate d'ammonium ferreux, fer/ascorbate, fer/citrate), le fer/ascorbate était le modèle qui induisait le plus de peroxydation lipidique. Fodor *et al.* (1988) arrivent à la même conclusion. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'ascorbate, par son pouvoir réducteur, permet d'obtenir le fer sous forme ferreux (Fe^{2+}). Le fer ferreux facilite la formation du très réactif radical hydroxyl à partir du peroxyde d'hydrogène, mais réinitialise aussi la peroxydation lipidique en formant un radical alkoxy à partir d'un peroxyde lipidique. Le fer ferreux peut donc agir en créant l'espèce réactive la plus puissante, connue pour attaquer tous les constituants cellulaires les plus proches de son lieu de synthèse (lipides, protéines et ADN). Mais il pourra également agir à un autre niveau en transformant la forme détoxifiée par les antioxydants des radicaux lipidiques en radicaux alkoxy. Même si les antioxydants tentent de protéger les lipides, ils seront immédiatement réactivés par le Fe^{2+} , ce qui affaiblira encore plus la cellule. Les efforts des antioxydants peuvent en quelque sorte être comparés à ceux que Sisyphe pouvait donner pour remonter un rocher qui redescend toujours avant d'atteindre le haut de la montagne.

Certaines études ont utilisé le peroxyde d'hydrogène ou la xanthine oxydase/xanthine comme pro-oxydant (Abrahamse *et al.* 1999, Anup *et al.* 1999, Bielefeldt *et al.* 1997, Duthie *et al.* 1999, Engler *et al.* 1999, Higashikubo *et al.* 1999, Karayalcin *et al.* 1990,

Karczewski *et al.* 1999, Manna *et al.* 1997, McKenzie *et al.* 1999, Rao *et al.* 1997). Bien que l'on observe une peroxydation lipidique avec ce modèle, les cellules subissent de trop forts dommages, comme la diminution de la viabilité cellulaire et une augmentation de la perméabilité paracellulaire. Cela aurait posé des problèmes importants pour notre étude, car l'on ne saurait pas si les effets observés sont dus à la peroxydation lipidique (et donc à un ensemble de mécanismes très subtiles) ou à une diminution de la viabilité cellulaire résultant d'un dysfonctionnement entérocytaire. De plus, nous nous devons d'avoir une étanchéité paracellulaire tout à fait impeccable, afin de pouvoir analyser l'absorption des lipides à travers la monocouche de cellules Caco-2 cultivées sur filtre. En effet, si nous avons augmenté la perméabilité paracellulaire, nous aurions « perforé » cette monocouche, et il serait impossible de dire ce qui traverse les cellules, par un phénomène d'absorption cellulaire, de ce qui passe entre les cellules par un phénomène non contrôlé de diffusion. L'utilisation de ménadione, de t-butyl hydroperoxyde, d'acide aminé oxydase (Baker *et al.* 1995 & 1993) ou de peroxydes lipidiques (Cepinskas *et al.* 1994) engendrent les mêmes conséquences que le peroxyde d'hydrogène ou la xanthine oxydase/xanthine. C'est pour les raisons que nous venons d'évoquer que nous avons préféré utiliser le modèle fer/ascorbate dans ce projet.

Comme le montre le premier article, le système fer/ascorbate est capable de provoquer une forte peroxydation lipidique au niveau des cellules Caco-2. Plusieurs études ont d'ailleurs démontré la participation du fer dans la peroxydation présente dans certaines pathologies comme l'athérosclérose (Quinn *et al.* 1987), les cancers (Halliwell *et al.* 1990), l'ischémie-reperfusion (Ferrari *et al.* 1990), les maladies inflammatoires de l'intestin (Parks 1989), et les conditions de surcharge en fer (Bacon *et al.* 1990 et 1996). En parallèle à cette peroxydation lipidique, la capacité d'estérification des lipides, ainsi que la synthèse de certaines apolipoprotéines (B48, AIV et AI) sont diminuées au niveau cellulaire. Par contre, on peut noter un accroissement de la synthèse *de novo* du cholestérol. Cela est associé à une augmentation de l'activité de l'enzyme HMG-CoA réductase. Par contre, aucune modification de l'activité ACAT n'a été observée. Ces deux enzymes semblent donc réagir différemment au stress oxydant. Ces événements intracellulaires peuvent se répercuter sur la composition lipidique au niveau circulatoire

(basolatéral), car la sécrétion des lipides estérifiés est diminuée, tandis que l'exocytose du cholestérol est augmentée. Au vue de ces altérations lipidiques et des modifications des apolipoprotéines, nous avons émis l'hypothèse que les vésicules lipoprotéiniques sont perturbées. Effectivement, l'isolement des lipoprotéines par ultracentrifugation prouve que la sécrétion des chylomicrons, VLDL, LDL et HDL est ralentie dans le milieu basolatéral. Des études précédentes ont bien illustré que le fer/ascorbate diminuait le transport du glucose dépendant du sodium au niveau de la bordure en brosse (Jourdeuil *et al.* 1993). Ces données supportent donc bien que le stress oxydant induit par le fer/ascorbate peut provoquer des désordres dans l'absorption des nutriments au niveau intestinal.

Il a récemment été démontré que le fer provoque des modifications au niveau des profils lipidiques plasmatique et hépatique (Brunet *et al.* 1999). En effet, on peut noter une hyperlipidémie (hypertriglycéridémie et hypercholestérolémie) ainsi qu'une modification dans la composition et dans la taille des lipoprotéines. Il est intéressant de noter que l'activité des enzymes hépatiques intervenant dans le carrefour du cholestérol est modifiée. En effet, l'activité de l'HMG-CoA reductase et de la cholestérol 7- α hydroxylase (responsable de la conversion du cholestérol en acides biliaires) est diminuée (Brunet *et al.* 1999). L'ensemble de ces modifications sont liées à un niveau élevé de la peroxydation lipidique au niveau plasmatique et hépatique (Brunet *et al.* 1999). De même, si l'on expose des microsomes de foie à du fer/ascorbate, on peut également observer une inhibition de l'HMG-CoA reductase, de la cholestérol 7- α hydroxylase et de l'ACAT (Brunet *et al.* 2000). Tout comme dans les études *in vivo* (Brunet *et al.* 1999), l'inhibition de ces enzymes semble être médiée par la modification physique des membranes des microsomes, comme la fluidité membranaire, résultant de la perte des acides gras polyinsaturés. Les enzymes peuvent avoir également été inhibées par les attaques peroxydatives directement sur la protéine (Brunet *et al.* 2000). Compte tenu de nos résultats, montrant une déficience de sécrétion des lipoprotéines par les cellules Caco-2 suite à un stress peroxydatif, on peut penser que l'hyperlipidémie, observée *in vivo* chez des animaux exposés à une diète enrichie en fer, est due

essentiellement à l'hypersécrétion hépatique. Nous concluons donc que les deux organes, foie et intestin, se comportent différemment en situation peroxydante.

D'autres enzymes entrant dans la synthèse des lipides peuvent être touchées par les effets pro-oxydants initiés par le fer/ascorbate. En effet, Il a été démontré que le fer/ascorbate est capable de diminuer *in vitro* l'activité de la glycérol-3-phosphate acyltransférase (enzyme clé responsable de la synthèse de glycérolipides) du foie (Thomas *et al.* 1990). C'est également le cas de l'acyl-CoA:-1-acyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine-*o*-acyltransférase (enzyme responsable de l'estérification des lysophospholipides en phospholipides) dont l'activité est diminuée au niveau de la rétine (Anfuso *et al.* 1994) et du cerveau (Alberghina *et al.* 1995). Il a même été observé que les radicaux libres affectent le cytochrome P-450 (Masuda *et al.* 1979). Par contre, l'activité de la CTP:phosphocholine cytidyltransférase (enzyme responsable du transfert de CTP sur les phospholipides) ne subit pas de modifications (Alberghina *et al.* 1995, Anfuso *et al.* 1994), ce qui démontre une sensibilité spécifique des enzymes face à un même stress oxydant.

Il était important de bloquer la peroxydation lipidique par un antioxydant puissant afin de déterminer si les modifications observées résultaient directement de la peroxydation générée par le fer/ascorbate. Auparavant, nous avons testé et comparé l'efficacité de quelques antioxydants fréquemment employés dans la littérature : la catalase, le mannitol, le tocophérol et l'hydroxytoluène butylé -BHT-. Comme le montre l'article 2, le BHT permet de contrer la peroxydation lipidique induite par le fer/ascorbate, aussi bien au niveau cellulaire qu'extracellulaire. La même ampleur de protection antioxydante n'est pas retrouvée avec la catalase, le mannitol et le tocophérol pour les différentes concentrations examinées, ce qui a orienté notre choix vers le BHT comme antioxydant. Il est toutefois intéressant de noter qu'il existe, dans le cas de la catalase et du tocophérol, une concentration à partir de laquelle l'antioxydant devient pro-oxydant. Pour sa part, le BHT est largement utilisé comme antioxydant dans l'industrie alimentaire pour stabiliser et préserver la fraîcheur, le goût, la couleur et les valeurs nutritives des aliments (Williams *et al.* 1999).

Nos expériences ont mis en évidence que l'ajout de BHT du côté apical permet de prévenir les diminutions de l'estérification des lipides et de la synthèse *de novo* d'apolipoprotéines au niveau cellulaire, induites par le fer/ascorbate. La synthèse de cholestérol est également corrigée par le BHT au niveau cellulaire, notamment en agissant sur l'activité de l'enzyme HMG-CoA réductase. Au niveau basolatéral par contre, les effets protecteurs du BHT sont moins importants. En effet, on peut observer que la sécrétion des lipides estérifiés ainsi que celle des apolipoprotéines (B100, B48, AIV) ne rejoignent pas les valeurs du témoin, même si l'on peut noter une amélioration par rapport au fer/ascorbate seul. On peut aussi relever que la sécrétion des lipoprotéines, à savoir les chylomicrons, les VLDL et les HDL, n'est pas corrigée en totalité. Par contre, l'export du cholestérol est quant à lui radicalement corrigé par l'ajout de l'antioxydant.

Nous découvrons donc que les perturbations, induites par le fer/ascorbate, dans le métabolisme lipidique sont normalisées à l'intérieur de la cellule par l'ajout de BHT. Cependant, ce dernier n'arrive pas à corriger en totalité les modifications de la sécrétion des lipides et apolipoprotéines. Pour essayer de comprendre ce phénomène, nous avons orienté nos recherches vers les protéines indispensables à la synthèse de lipoprotéines, c'est à dire la L-FABP et le MTP. En effet, ces protéines pourraient être affectées par le fer/ascorbate et le transport des lipides pourrait ainsi être perturbé. Or, nos expériences montrent que l'expression protéique de la L-FABP n'est modifiée ni par le fer/ascorbate, ni par le BHT. Il est intéressant de noter que quelques études ont démontré que les FABP pouvaient présenter des pouvoirs antioxydants, notamment en jouant le rôle de « scavenger » du radical hydroxyl (Samanta *et al.* 1989), en complexant les acides gras polyinsaturés (rôle protecteur), ce qui diminue leur disponibilité dans la cellule (Ek *et al.* 1997) et enfin, en éliminant les acides gras polyinsaturés des membranes microsomiales, ce qui diminue leur exposition aux pro-oxydants (Catala *et al.* 1994). Nous aurions pu également nous attendre à une augmentation de l'expression protéique de la L-FABP dans les cellules Caco-2 exposées au fer/ascorbate ; cette protéine jouerait alors le rôle d'antioxydant endogène pour contrecarrer les effets néfastes de la peroxydation lipidique. Mais ce n'est pas le cas. Il faut savoir que les études précédemment citées sont des expériences *in vitro*, où l'on incube des microsomes ou des préparations

d'enzymes en présence ou en absence de FABP, ce qui explique peut être la différence avec nos résultats, qui eux, sont réalisés sur des cellules entières. Nous nous sommes également penché sur le cas du MTP. Nos résultats démontrent que ni le fer/ascorbate, ni le BHT ne modifient l'expression protéique du MTP (figure 4). La diminution de la sécrétion des lipoprotéines dans le milieu basolatéral ne repose donc pas sur une altération de l'expression du MTP et/ou de la L-FABP, qui par opposition à l'apolipoprotéine B-48, ne sont pas des protéines membranaires. Nous considérons donc que d'autres éléments peuvent entrer en ligne de compte dans la perturbation de la sécrétion des lipoprotéines. En effet, il a été démontré que le stress oxydant peut augmenter la phosphorylation des protéines cellulaires par ses actions sur le calcium cytosolique et sur les protéines kinases et phosphatases (Suzuki *et al.* 1997). Des études ont maintenant bien établi que l'augmentation de la phosphorylation intracellulaire de l'apolipoprotéine B diminue la sécrétion des deux formes d'apolipoprotéines B sans pour autant altérer leur synthèse (Mathur *et al.* 1993). De façon similaire, l'hyperphosphorylation des protéines tau associées aux microtubules est associée à la désorganisation du cytosquelette microtubulaire (Kivatinitz *et al.* 1997). D'autres études sont nécessaires pour explorer si les effets perturbateurs du fer/ascorbate sur la sécrétion des lipoprotéines sont dépendants de l'état de phosphorylation de l'apolipoprotéine B et des microtubules. Comme nous l'avons mentionné, les modifications des propriétés physiques de membranes du réticulum endoplasmique par la peroxydation lipidique induite par le fer/ascorbate pouvaient perturber le fonctionnement des enzymes intervenant dans le métabolisme des lipides (Brunet *et al.* 1997, 1999 et 2000). Probablement, les dérangements de la membrane du réticulum endoplasmique altèrent la composition lipidique et fragilisent son intégrité, affectant ainsi les protéines membranaires et le métabolisme local. Parmi les conséquences majeures potentielles, on pourrait retrouver les modifications de l'apolipoprotéine B et de la sécrétion des lipoprotéines.

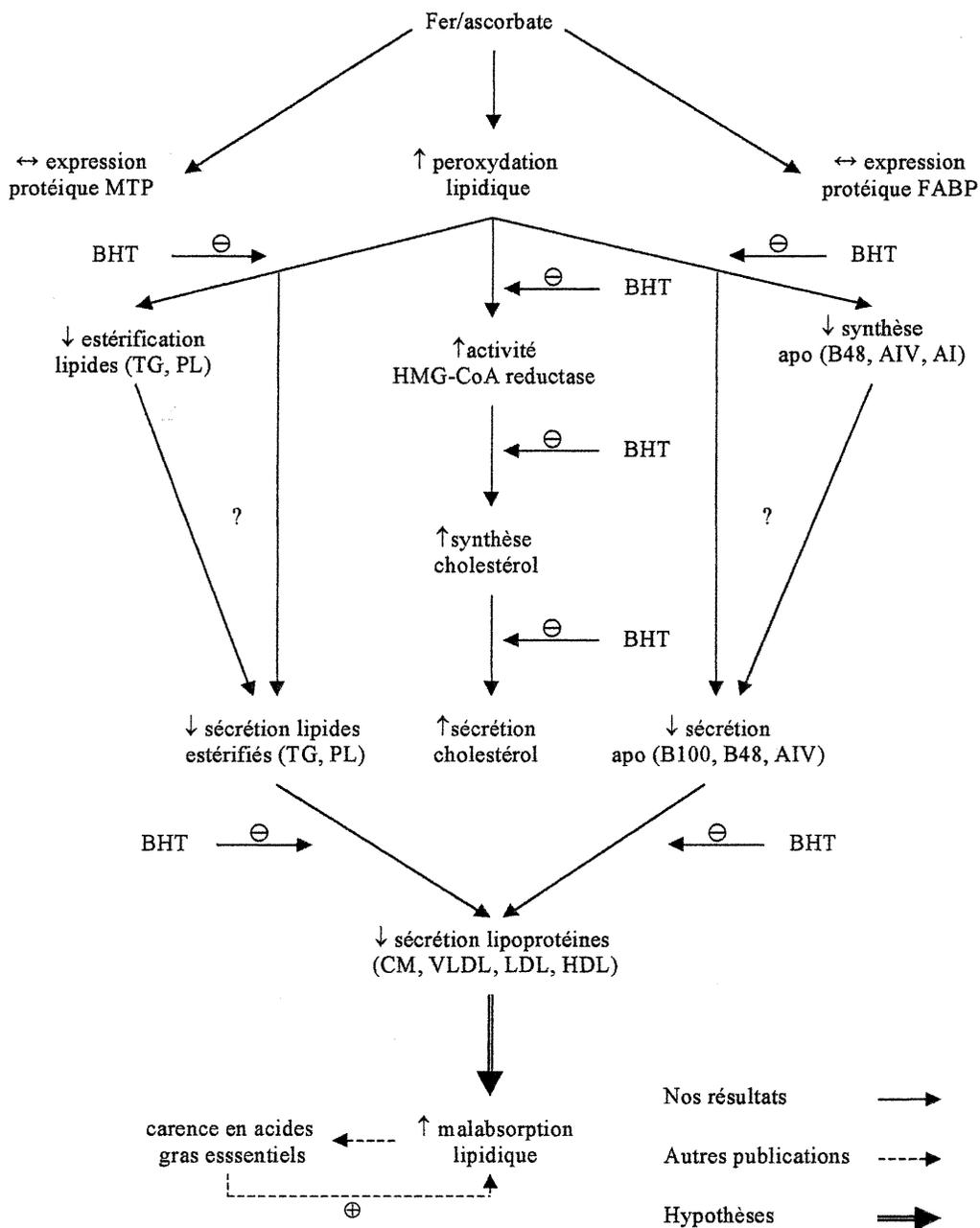


Figure 4 : Schéma récapitulatif de l'implication de la peroxydation lipidique, induite par le fer/ascorbate, sur le métabolisme des lipides au niveau des cellules Caco-2.

Nous avons vu que le BHT, en présence de fer/ascorbate, corrige la peroxydation lipidique ainsi que les perturbations dans l'estérification des lipides et dans la synthèse du cholestérol et des apolipoprotéines. Les attaques peroxydatives du fer/ascorbate sont donc responsables de ces perturbations du métabolisme des lipides au niveau cellulaire. Cependant, les modifications dans la sécrétion des lipides et apolipoprotéines semblent en partie relever d'une interaction directe du fer sur des constituants cellulaires, n'impliquant pas entièrement la peroxydation lipidique induite par le fer/ascorbate. Des études antérieures ont bien démontré que certaines protéines peuvent être directement modifiées par la présence d'ions fer (Bartfay *et al.* 1999, Buranaprapuk *et al.* 1998, Conley *et al.* 1965, Halliwell *et al.* 1991). C'est le cas, par exemple, de la glutathion peroxydase, de la sérum albumine et de la carboxypeptidase A (Bartfay *et al.* 1999, Buranaprapuk *et al.* 1998). Il n'existe pas encore de travaux réalisés sur les effets directs du fer sur des protéines ou autres constituants impliqués dans le transport des lipides au niveau entérocytaire, et il serait intéressant de se pencher sur cette question. Nos études mettent en relief deux phénomènes dans le modèle que nous avons étudié : des effets dus à la peroxydation lipidique et ceux en relation directe avec le fer. Murthy *et al.* (1998) ont montré, de leur côté, une diminution de la sécrétion des lipoprotéines dans le milieu basolatéral en présence d'acide 13-hydroxy octadecadiénoïque, c'est-à-dire un alcool d'acide gras (LOH). Il s'agit là de la forme détoxifiée d'un radical peroxy par l'intervention d'un donneur de proton (comme l' α -tocophérol ou le BHT : $LOO\bullet \rightarrow LOOH$) puis de la glutathion peroxydase ($LOOH \rightarrow LOH$). L'acide 13-hydroxy octadecadiénoïque est capable de réduire la sécrétion de lipoprotéines dans le milieu basolatéral sans que ni l'expression protéique du MTP ni la synthèse *de novo* d'apolipoprotéines ne soient affectées. On ne peut s'empêcher de penser que les alcools d'acides gras pourraient être en concentration assez élevée dans les cellules Caco-2, suite à l'intervention du BHT puis de la glutathion peroxydase pour faire disparaître les radicaux alkoxy ou peroxy lipidiques ($LO\bullet$ et $LOO\bullet$). Ce qui expliquerait, peut-être, pourquoi la présence de BHT n'arrive pas à corriger les effets du fer/ascorbate au niveau basolatéral. On pourrait alors imaginer que cela serait un mécanisme de défense de la cellule intestinale pour éviter de mettre en circulation des lipides dénaturés, pouvant avoir des effets néfastes sur l'organisme.

Nous voyons donc que la peroxydation lipidique induite par le fer/ascorbate est capable de perturber le métabolisme intestinal des lipides, notamment au niveau de l'absorption. Ce phénomène est important, et pourrait être mis à contribution dans des cas cliniques bien précis, tels que les maladies inflammatoires de l'intestin. Récemment, notre laboratoire et d'autres équipes ont montré la présence d'une quantité élevée d'espèces réactives chez des patients atteints de la maladie de Crohn, caractérisés souvent par une malabsorption (Grisham *et al.* 1992, Levy *et al.* 2000, Lih-Brody *et al.* 1996, Mahida *et al.* 1989, Middleton *et al.* 1993, Simmonds *et al.* 1992, Williams *et al.* 1990). Comme il s'agit de pathologies inflammatoires, les cytokines jouent certainement un rôle important sur le transport des lipides au niveau de l'intestin. En effet, Mehran *et al.* (1995) ont démontré que le TNF α était capable de diminuer la synthèse des lipides et d'apolipoprotéines, ainsi que la sécrétion de lipoprotéines. Le stress oxydant, selon nos études, peut avoir les mêmes effets. Nous voyons donc que, dans le cas des maladies inflammatoires de l'intestin, deux phénomènes interviennent dans la diminution de l'absorption des lipides au niveau intestinal : les cytokines et le stress oxydant. Il ne faut pas rejeter également l'idée que ces deux éléments peuvent être liés car, on sait que les cytokines font intervenir des espèces réactives comme seconds messagers (Suzuki *et al.* 1997). Il faut aussi souligner le fait que le stress oxydant, par ses attaques peroxydatives au niveau des membranes cellulaires, peut diminuer le contenu de ces dernières en acides gras essentiels, ce qui pourrait modifier le transport des graisses alimentaires (Levy *et al.* 1992). Il serait intéressant de voir si l'ajout d'antioxydants puissants pourraient inhiber les effets observés sur le métabolisme des lipides induits par le TNF α . Nous saurions ainsi si les effets observés sur les lipides lors d'une exposition au TNF α sont dus à ce dernier lui-même, ou au stress oxydant induit par celui-ci.

Un des facteurs souvent évoqués dans l'étiologie des maladies inflammatoires de l'intestin est relié à la perméabilité substantiellement augmentée au niveau intestinal. L'invasion microbienne déclenche alors des réactions pro-inflammatoires. Nous avons évalué la possibilité que les LPS, seuls ou associés à des pro-oxydants, sont capables d'initier un processus oxydatif qui, à son tour, peut promouvoir l'inflammation. Les bactéries intestinales sont connues pour être des éléments importants dans l'activation des processus inflammatoires locaux (MacDermott 1999). En outre, les

lipopolysaccharides -endotoxines présentes dans la paroi cellulaire des bactéries (Olaya *et al.* 1999)- ; permettent la translocation bactérienne par la perturbation physique de la barrière intestinale (Deitch *et al.* 1989, Wells *et al.* 1993). Des études montrent que les bactéries pénètrent à travers et entre les cellules intestinales (Alexander *et al.* 1990, Wells *et al.* 1993). Ainsi, l'altération des propriétés physiques de la bordure en brosse et, à un moindre niveau, des jonctions serrées, induites par un stress oxydant pourraient-elles être un facteur favorisant la translocation bactérienne ? L'article 3 nous montre que les lipopolysaccharides sont capables de produire une peroxydation lipidique au niveau cellulaire, et ce de manière dose dépendante. Par contre, au niveau apical, les lipopolysaccharides ne produisent pas de peroxydation lipidique de manière dose dépendante. Une des explications de ce phénomène repose sur le fait que les lipopolysaccharides peuvent augmenter l'expression endogène de la nitrique oxyde synthase inductive (Brown *et al.* 1997, Chamulitrat *et al.* 1996a, Mercer *et al.* 1996, Wells *et al.* 1990). L'oxyde nitrique résultant ou ses pro-oxydants (le peroxy-nitrite puis le radical hydroxyl) contribuent au stress oxydant apporté par les lipopolysaccharides aux cellules intestinales (Chamulitrat *et al.* 1996b). Par contre, les lipopolysaccharides provoquent peu ou pas d'altérations importantes au niveau de la viabilité et de l'intégrité cellulaire, comme le démontre le test de la perméabilité paracellulaire (résistance trans-épithéliale), et le contenu de protéines cellulaires. L'activité de la sucrase est quant à elle légèrement diminuée par la grande concentration des lipopolysaccharides. En accord avec quelques balbutiements de la littérature, les acides gras à chaînes courtes semblent atténuer les effets peroxydatifs. En effet, il a été rapporté que le butyrate et l'acétate minimisent les dommages sur l'ADN, induits par le peroxyde d'hydrogène sur des cellules du colon (Abrahamse *et al.* 1999). Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si le butyrate est démuné d'action pro-oxydante. Nos résultats indiquent que le butyrate ne provoque pas de peroxydation lipidique, tant au niveau cellulaire qu'au niveau du milieu apical, et ce quelque soit la dose employée. Il ne présente pas non plus d'altérations importantes au niveau de la viabilité et de l'intégrité cellulaire (perméabilité paracellulaire, activité de la sucrase, contenu de protéines cellulaires). Il est intéressant de voir que l'ajout du pro-oxydant fer/ascorbate (0,2 mM : 2 mM) aux lipopolysaccharides (100 µg/mL) augmente la peroxydation lipidique par rapport aux

lipopolysaccharides seuls (100 µg/mL) dans le compartiment cellulaire comme dans le milieu apical. Cela donne donc un modèle pro-oxydant très puissant. Le butyrate à une concentration de 2,5 mM est capable de diminuer la peroxydation lipidique induite par les lipopolysaccharides. Cependant, l'ajout de BHT (200 µM) est nécessaire au butyrate pour contrer totalement la peroxydation lipidique induite par les lipopolysaccharides. Par contre, si le butyrate démontre quelques protections contre la peroxydation lipidique induite par le modèle fer/ascorbate/lipopolysaccharides surtout dans les cellules, son potentiel demeure limité. Cette action bénéfique du butyrate pourrait être induite suite à une augmentation de l'expression et l'activité d'enzymes antioxydantes, telle que la glutathion-S-transferase-pi, dans les cellules Caco-2, ce qui augmente donc les défenses endogènes de la cellule face aux pro-oxydants présents dans le milieu. Les propriétés du butyrate sur la cytodifférenciation pourraient constituer une seconde cause (Stein *et al.* 1996, Utesch *et al.* 1993).

Les lipopolysaccharides, le fer/ascorbate et l'ensemble fer/ascorbate/lipopolysaccharides présentent donc des propriétés pro-oxydantes que le butyrate et le BHT peuvent contrer. Cependant, ils n'altèrent pas pour autant la viabilité et l'intégrité cellulaire, même si l'on peut noter une légère diminution de l'activité de la sucrase en présence de fer/ascorbate/lipopolysaccharides. Encore une fois, les effets sur la sucrase sont certainement dus aux lipopolysaccharides, et l'on peut penser, plus particulièrement, à une implication peroxydative de ces derniers sur l'activité de l'enzyme, car l'ajout de BHT et de butyrate permet de corriger les effets. Il s'agit certainement d'effets pro-oxydants utilisant des mécanismes différents de ceux du fer/ascorbate, ce dernier n'altérant pas l'enzyme malgré les forts niveaux de MDA.

Quand on considère les propriétés physiques de la bordure en brosse, on peut noter que le fer/ascorbate et l'ensemble fer/ascorbate/lipopolysaccharides sont capables d'augmenter significativement le paramètre d'anisotropie, témoin de la diminution de la fluidité membranaire. Le fer/ascorbate semble être le principal responsable des effets observés sur la bordure en brosse dans le couple fer/ascorbate/lipopolysaccharides, car d'une part les modifications apportées par les lipopolysaccharides seuls ne sont pas significativement différentes du témoin, et qu'en outre, il ne semble pas y avoir d'effets synergiques dans le cas fer/ascorbate/lipopolysaccharides (c'est-à-dire qu'il n'y a pas

d'effets supérieurs à la somme fer/ascorbate seuls et lipopolysaccharides seuls). Nous savons que le fer/ascorbate est un puissant pro-oxydant ; les lipopolysaccharides sont également pro-oxydants, mais à un niveau plus faible. Les effets observés sur la bordure en brosse sont certainement dus à la peroxydation lipidique induite par ces agents. Ainsi, un pro-oxydant puissant (fer/ascorbate) induit une peroxydation lipidique élevée, et modifie alors grandement les propriétés physiques de la membrane apicale. En contrepartie, un pro-oxydant beaucoup moins puissant (les lipopolysaccharides) induit une peroxydation lipidique plus modeste, et modifie modestement les propriétés physiques de la membrane apicale. Cela est d'autant plus vrai que l'ajout de butyrate, et surtout de BHT inhibe les effets du fer/ascorbate/lipopolysaccharides sur les propriétés physiques de la bordure en brosse. Cependant, il ne faut pas oublier que le butyrate est également connu pour augmenter l'expression de la phospholipase A2 (Perez *et al.* 1998), enzyme responsable de l'hydrolyse des acides gras oxydés des phospholipides, étape nécessaire à la réparation des phospholipides membranaires oxydés (van den Berg *et al.* 1993).

En se penchant sur la perméabilité paracellulaire, on peut se rendre compte que ni le butyrate ni le BHT ne la modifient. Il est intéressant de voir que la présence simultanée de butyrate et de BHT diminuent de manière synergique le flux de [¹⁴C]-polyéthylène glycol entre le milieu apical et basolatéral (témoin d'une diminution de la perméabilité paracellulaire). Il a été démontré, chez les cellules Caco-2 peu différenciées, que le butyrate seul peut augmenter la perméabilité paracellulaire (Mariadason *et al.* 1997). Or, dans notre étude, nos cellules sont déjà bien différenciées (21 jours post-confluence) ; ceci explique pourquoi nous n'avons pas observé une diminution de la perméabilité paracellulaire dans le cas du butyrate seul. Par contre, la présence de BHT semble être nécessaire pour observer ces mêmes effets par le butyrate chez les cellules Caco-2 différenciées. D'autres études sont nécessaires pour expliquer ce phénomène et les mécanismes impliqués. Les lipopolysaccharides seuls et le fer/ascorbate ne modifient pas eux non plus la perméabilité paracellulaire, même si l'on observe une augmentation non significative de la perméabilité paracellulaire. La présence simultanée de fer/ascorbate et de lipopolysaccharides est nécessaire pour provoquer une augmentation de la perméabilité paracellulaire, certainement parce que le

stress oxydant engendré par le couple fer/ascorbate/lipopolysaccharides est suffisant pour entraîner des dommages aux jonctions serrées (Baker *et al.* 1995, Rao *et al.* 1997, Manna *et al.* 1997). Encore une fois, non accompagné de BHT, le butyrate n'est pas assez efficace pour contrer les effets du fer/ascorbate/lipopolysaccharides sur la perméabilité paracellulaire. En effet, l'ajout de BHT est nécessaire pour un retour à des valeurs significativement identiques à celles du témoin.

Ainsi, suite à un stress oxydant provoqué par les endotoxines bactériennes et les pro-oxydants, les effets observés sur la fluidité membranaire et la perméabilité paracellulaire peuvent être de la plus haute importance dans l'aggravation des maladies inflammatoires intestinales. La peroxydation des cellules épithéliales pourrait affaiblir la fonction de barrière intestinale et ainsi favoriser la translocation bactérienne, d'où l'activation des processus inflammatoires locaux (MacDermott 1999). Dans ce cas, un cercle vicieux est alors enclenché (figure 5).

Une autre composante importante de notre travail concerne les effets du stress oxydant sur l'enzyme cyclooxygénase. Il existe deux isoformes de cyclooxygénase : la cyclooxygénase-1 (COX-1) qui synthétise des prostaglandines impliquées dans l'activité normale de la cellule, et la cyclooxygénase-2 (COX-2) qui synthétise des prostaglandines pro-inflammatoires (PGE₂ par exemple), principalement sur les lieux de l'inflammation (Geis *et al.* 1999, Hendel *et al.* 1997). En outre, il a été démontré que l'enzyme COX-2 est détectée dans les cellules épithéliales de patients atteints de la maladie de Crohn ou de colite ulcéreuse, alors qu'elle n'est pas détectée dans les cellules épithéliales de d'individus témoins (Singer *et al.* 1998, Wiercinska-Drapalo *et al.* 1999). Nous savons que l'expression de l'enzyme COX-2 peut être induite par des stimuli pro-inflammatoires (Folco 1996), mais aussi pro-oxydants (Adderley *et al.* 1997, Feng *et al.* 1995, Karayalcin *et al.* 1990).

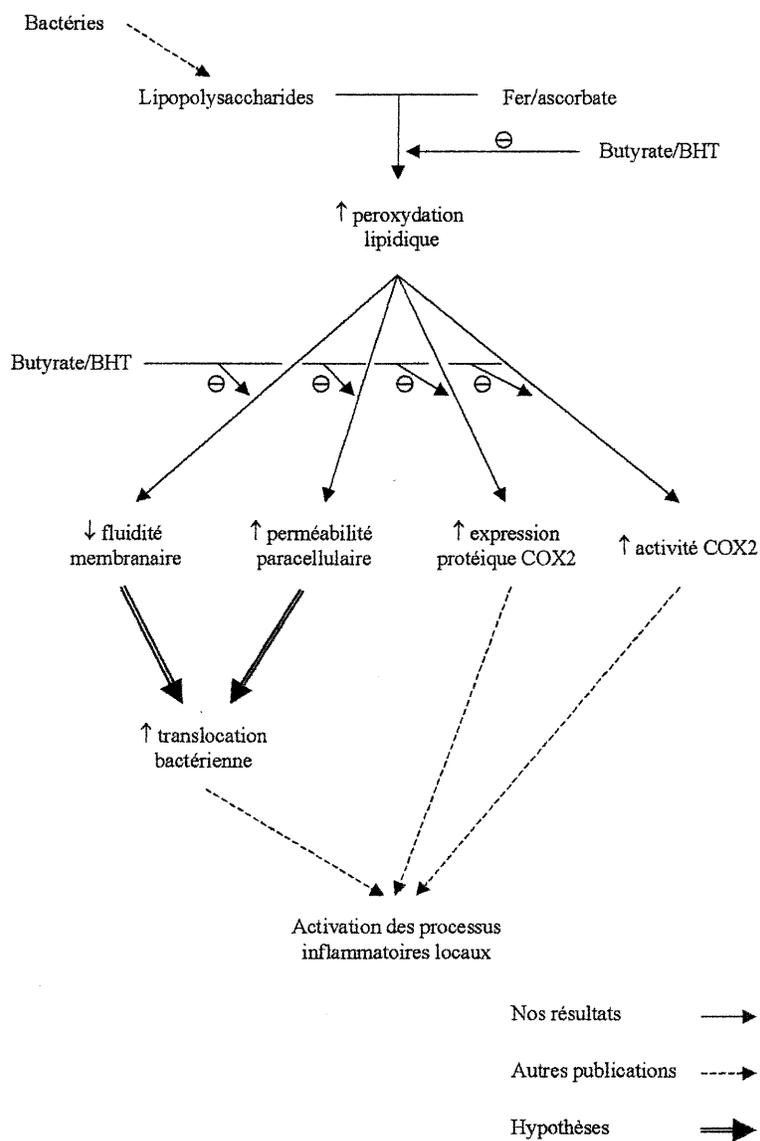


Figure 5 : Schéma récapitulatif de l'implication de la peroxydation lipidique induite par le fer/ascorbate/lipopolysaccharides dans l'activation des processus inflammatoires intestinaux.

Les lipopolysaccharides seuls augmentent significativement l'activité de l'enzyme COX-2 et son expression protéique. Il était déjà connu que les lipopolysaccharides sont capables d'augmenter l'activité et l'expression protéique de l'enzyme COX-2, par activation de l'enzyme iNOS (Longo *et al.* 1998a et 1998b, Salvemini *et al.* 1995). Le fer/ascorbate, quant à lui, est capable de provoquer une augmentation significative de l'activité de l'enzyme COX-2, sans modifier son expression protéique. Il se peut que les fer/ascorbate, par ses effets peroxydants sur les acides gras polyinsaturés, fournisse ainsi plus des substrats à l'enzyme. Mais le couple fer/ascorbate/lipopolysaccharides est capable d'induire à la fois l'activité et l'expression protéique de l'enzyme COX-2 de manière très importante. Bien que le butyrate arrive à corriger l'activation de l'enzyme COX-2 induite par les lipopolysaccharides, il est incapable de diminuer les effets du fer/ascorbate/lipopolysaccharides sur l'activité et l'expression protéique de l'enzyme COX-2. En effet, l'ajout de BHT au butyrate est nécessaire pour inhiber complètement les effets du fer/ascorbate/lipopolysaccharides.

Nous apercevons que le stress oxydant semble être un facteur important dans l'augmentation de l'expression protéique et surtout de l'activité de l'enzyme COX-2. En effet, la présence de molécules antioxydantes permet d'inhiber les effets du fer/ascorbate/lipopolysaccharides, et de retourner à des niveaux normaux, identiques à ceux du témoin (figure 5). Il apparaît donc que le stress oxydant induit par les bactéries (endotoxines) et par les autres éléments pro-oxydants (phagocytes, « contaminants » alimentaires) présents dans l'intestin pourrait être un facteur important de propagation de l'inflammation, en favorisant d'une part la translocation bactérienne et en augmentant d'autre part la production de prostaglandines pro-inflammatoires. Le stress oxydant devrait donc être maintenant considéré comme un élément important dans la propagation des manifestations cliniques des maladies inflammatoires de l'intestin.

Cependant, il faut tenir compte du fait que ces études sont effectuées sur des cellules en cultures, et qui plus est, des cellules cancéreuses coloniques. Bien qu'elles présentent des propriétés très importantes pour la recherche fondamentale et la compréhension de la physiopathologie intestinale, les résultats de ces recherches devront être confirmés dans d'autres modèles expérimentaux et par des études cliniques sur des patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin. En effet, il n'existe hélas pas

d'études sur des animaux, et encore moins d'études cliniques, traitant des différents points précis que nous venons d'aborder. Nous savons déjà que ces pathologies ont la particularité de montrer des niveaux de stress oxydant élevés, ainsi que des problèmes d'absorption de nombreux nutriments. Il serait donc intéressant de voir si l'apport contrôlé de nutriments antioxydants et/ou anti-inflammatoires pourrait réduire le nombre d'épisodes ainsi que l'activité de la maladie.

Une approche nutritionnelle existe déjà pour les maladies inflammatoires de l'intestin (annexe 15) afin de « promouvoir un état nutritionnel optimal, en apportant une attention particulière à la compétence immunitaire, de provoquer une rémission clinique aussi longue que possible, et de prévenir ou retarder une intervention chirurgicale ». Les recommandations nutritionnelles proposent une restriction en fibres alimentaires en présence de douleurs abdominales, de diarrhées et de saignements, et surtout de rétrécissement intestinal. Cela réduit donc les éléments précurseurs nécessaires à la synthèse de butyrate par les bactéries au niveau intestinal, celui-ci pouvant servir, entre autre, à protéger la barrière intestinale et à réduire la peroxydation lipidique. Cependant, quelques études récentes ont démontré que l'apport de fibres pendant les phases de rémission permettent d'augmenter la durée de cette dernière (Fernandez-Banares *et al.* 1999, Mitsuyama *et al.* 1999). Il existe d'autres aliments contenant du butyrate, et ce de manière naturelle. C'est le cas du lait et des produits laitiers gras. Cependant, une restriction en lactose peut avoir lieu chez ces patients, car une intolérance au lactose est connue pour favoriser l'apparition de diarrhées et augmenter le volume des selles, accentuant ainsi les sensations de malaises. Il se peut que ces patients doivent limiter voire supprimer les produits laitiers. Les stratégies possibles seraient par exemple de donner le butyrate sous forme de supplément pendant les phases aiguës et post-aiguës, même si certaines études montrent que la supplémentation en n-butyrate donne des résultats peu convaincants (Burke *et al.* 1998). Il faut quand même savoir que le butyrate peut être absorbé au niveau de l'estomac, et peut ainsi avoir plus de difficultés à atteindre l'intestin, ce qui expliquerait son manque d'efficacité dans ces études. En effet, des lavements rectaux avec du butyrate ont donné des résultats intéressants pour la rémission de certains patients (Scheppach *et al.* 1996 et 1997, Vernia *et al.* 1995). Il est possible aussi de se concentrer sur les périodes de rémission, où le patient peut se

remettre progressivement à un régime alimentaire normal. Enfin, il est nécessaire de déterminer la tolérance individuelle des patients. Ce dernier point est de la plus haute importance, car cela permet d'inclure les nutriments nécessaires à la rémission du patient. Quoiqu'il en soit, le butyrate, source d'énergie importante pour les colonocytes, semble être un élément important dans les maladies inflammatoires de l'intestin. Il a en effet été démontré que son métabolisme est affecté au niveau des colonocytes de ces patients, et ce particulièrement pendant les phases aiguës (Burke *et al.* 1998, Den Hond *et al.* 1998, Duffy *et al.* 1998, Moore *et al.* 1997b). En outre, le butyrate possède la particularité de diminuer la sécrétion de cytokines proinflammatoires au niveau de cellules cryptales du colon, démontrant un rôle anti-inflammatoire important à considérer pour la rémission des patients (Gibson *et al.* 1995). Il a aussi été démontré que la présence de certaines substances dans l'environnement intestinal perturbaient le métabolisme du butyrate. Il s'agit, entre autre, des sulfides qui sont capables d'inhiber les enzymes short chain acyl-CoA dehydrogenases (Babidge *et al.* 1998, Moore *et al.* 1997a). En effet, le soufre est essentiel pour la fermentation dans le colon et la formation de n-butyrate, mais le nombre de bactéries réduisant le sulfate et la sulfidogénèse est plus élevé dans les cas de maladies inflammatoires de l'intestin, augmentant ainsi la quantité de sulfides (Roediger *et al.* 1997). En outre, une étude a démontré que l'ajout de butyrate diminue l'hyperprolifération induite par le sulfide sur des biopsies de muqueuses de l'anse sigmoïde de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (Christl *et al.* 1996). Les sulfides sont principalement détoxifiés par méthylation dans les cellules épithéliales du colon et dans les globules rouges circulants (Roediger *et al.* 1997). Il serait intéressant d'examiner l'influence du stress oxydant sur les enzymes short chain acyl-CoA dehydrogenases et celles responsables de la détoxification par méthylation. Si c'était le cas, il serait utile de déterminer si cela se vérifie dans les cas de maladies inflammatoires de l'intestin. Finalement, il serait avantageux de constater si l'ajout d'antioxydants alimentaires pourrait « protéger » le métabolisme du butyrate pour pouvoir ainsi en retirer le maximum d'effets bénéfiques.

Nous avons vu dans l'introduction que, contrairement aux études *in vitro*, la supplémentation en vitamine C chez les personnes souffrant d'une surcharge en fer (hémochromatose, b-thalassémie) semble ne pas être dangereuse *in vivo*. En effet, les

rare études traitant de ce sujet montrent que la présence simultanée de fer et d'acide ascorbique en concentration élevée diminue la peroxydation lipidique au niveau plasmatique et hépatique, alors que la présence de fer sans supplémentation en vitamine C provoque une peroxydation lipidique (Barja *et al.* 1994, Cadenas *et al.* 1998, Collis *et al.* 1997, Proeggente *et al.* 2000). Cependant, une étude chez le rat a démontré que l'ingestion combinée de fer et d'ascorbate augmente la peroxydation lipidique au niveau de la muqueuse intestinale, et ce en présence d'éthanol et d'huile de poissons (Kaur *et al.* 1998). Et c'est bien là la différence avec les autres études : la peroxydation lipidique a été mesurée au niveau de la muqueuse intestinale, et non au niveau plasmatique ou hépatique. Il est clair qu'il ne s'agit pas là d'une étude traitant uniquement de l'ingestion combinée de fer et d'ascorbate. En effet, l'éthanol est déjà pro-oxydant en présence d'huiles riches en acides gras à chaîne longue et polyinsaturés (Kaur *et al.* 1998). L'ajout de fer/ascorbate peut simplement exacerber ces effets néfastes. Mais, bien que Parks (1989) ait affirmé que l'ingestion de fer/ascorbate, présents dans les suppléments multi-vitamines et minéraux, soient pro-oxydants au niveau de l'intestin (il n'y a aucune référence à une étude démontrant cela dans cette review), il n'existe pour l'instant aucune recherche sérieuse *in vivo* traitant des effets pro-oxydants de l'ingestion simultanée de fer et d'ascorbate. En effet, dans de tels modèles, l'effort est porté uniquement sur l'aide que l'ascorbate peut fournir à l'absorption du fer alimentaire, par son pouvoir réducteur. On sait déjà que l'ingestion de fer en excès provoque une peroxydation lipidique au niveau intestinal (Mizoguchi *et al.* 1994, Srigiridhar *et al.* 1997), alors qu'au niveau du colon, la présence d'une peroxydation lipidique est discutée (Porres *et al.* 1999, Rimbach *et al.* 1997, Siegers *et al.* 1992, Soyars *et al.* 1998, Wright *et al.* 1999). Une étude a démontré que le fer alimentaire induisait bien une peroxydation lipidique au niveau du foie comme le soulignent d'autres investigations, mais l'ajout d'acide ascorbique inhibe la peroxydation lipidique induite par le fer (Collis *et al.* 1997). Est-ce que cela se produit également au niveau de l'intestin ? Il demeure à scruter si l'ajout d'ascorbate peut exacerber les effets pro-oxydants du fer ou au contraire les inhiber au niveau intestinal. Ce domaine demande efforts supplémentaires afin d'élucider le rôle de la peroxydation dans des états pathophysiologiques. Cela ne remet pas du tout notre travail en cause, car il faut rappeler que le couple fer/ascorbate

est avant tout un modèle expérimental pour simuler un stress oxydant au niveau intestinal, comme cela est le cas dans certaines pathologies.

L'apport d'antioxydants représente un aspect crucial. En effet, suite à nos études, nous pensons qu'il faut maîtriser le stress oxydant afin de briser le cercle vicieux auquel il participe. On peut observer une diminution significative de la capacité antioxydante (les taux d'antioxydants, de vitamines et de minéraux sériques, l'activité de la glutathion peroxydase et de superoxyde dismutase) chez les patients atteints de la maladie de Crohn en période active, et ce comparé aux patients atteints de la maladie de Crohn en période inactive et aux témoins (Geerling *et al.* 1999 et 1998, Sturniolo *et al.* 1998). En outre, les défenses antioxydantes des patients atteints de la maladie de Crohn en période inactive sont diminuées par rapport à celles du témoin (Geerling *et al.* 1999), montrant ainsi une relation inverse entre la gravité de la maladie et la force des défenses antioxydantes. Certains investigateurs rapportent la diminution de moitié des caroténoïdes plasmatiques (alpha-carotène, beta-carotène et cryptoxanthine) chez ces patients, alors que les niveaux de gamma-tocophérol et d'ubiquinone sont augmentés et les concentrations de rétinol et d'alpha-tocopherol ne varient pas significativement des témoins (Genser *et al.* 1999). Ces variations des niveaux plasmatiques des antioxydants liposolubles sont corrélées avec la diminution du potentiel antioxydant à piéger les espèces radicalaires (TRAP ; total radical-trapping antioxidant potential) (Genser *et al.* 1999). Cela est d'autant plus grave que l'on peut observer au niveau de la muqueuse une augmentation du stress oxydant sur l'ADN [8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)], sur les protéines (groupements carbonyles), et une augmentation des niveaux de fer, ce qui confirme la validité de l'utilisation du fer dans nos expériences. En parallèle, on peut observer une diminution de l'activité de la Cu-Zn-SOD (Lih-Brody *et al.* 1996).

Quand on fait intervenir les antioxydants, on pense à contrer les effets des phagocytes et de la muqueuse intestinale, conséquence de l'inflammation. Cependant, certains antioxydants (l'hydroxyanisole butylé, le tetrahydropapaveroline et l'acide nordihydroguaiaretique) présentent la particularité d'inhiber la production de cytokines par les phagocytes (IL-1 et IL-6) et par la muqueuse du colon (IL-1 et TNF) chez les

patients souffrant de maladies inflammatoires de l'intestin (Reimund *et al.* 1998). Cela démontre encore plus que ces antioxydants peuvent agir directement sur l'inflammation elle-même, et pas seulement les conséquences de l'inflammation.

Certaines molécules antioxydantes (la stobadine ou le rutoside), permettent de prévenir la diminution de la quantité de glutathion réduit dans le cas d'une colite induite expérimentalement (par l'acide acétique ou l'acide trinitrobenzenesulfonique), avec, en parallèle, une réduction des atteintes au niveau de la muqueuse colique, une abolition de l'augmentation de l'activité de la myeloperoxydase, et une atténuation de l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Cruz *et al.* 1998, Nosal'ova *et al.* 1999). Il semble que l'ajout d'antioxydant soit plus efficace sur les individus exposés longtemps à l'inflammation que sur ceux exposés plus brièvement (c'est à dire de façon aiguë) (Yavuz *et al.* 1999). Cet aspect de comparaison entre l'aiguë et le chronique montré dans l'étude de Yavuz *et al.* (1999) est intéressant. Il permet d'observer l'évolution de l'apport d'antioxydants dans l'alimentation des patients. Il serait donc possible de donner dans les premiers temps des antioxydants très puissants, afin de se servir d'autres antioxydants moins puissants, mais possédant peut-être moins d'effets intrinsèques (comme par exemple celui de perturber le métabolisme des lipides indépendamment du phénomène pro- et antioxydants). On sait déjà que certaines molécules peuvent avoir un pouvoir antioxydant dans certains systèmes mais beaucoup moins dans d'autres, tout en restant dans le même organe. C'est le cas de l'ascorbate qui est totalement antioxydant dans des biopsies de rectum de patients souffrant de colite ulcéreuse et beaucoup moins dans des cellules exposées au couple xanthine/xanthine oxydase, avec ou sans myeloperoxydase (Simmonds *et al.* 1999). Par contre, le N-acétyl cystéine (10 mM), et le glutathion oxydé et réduit (10 mM) inhibent complètement la production d'espèces réactives dans les cellules mais pas dans les biopsies (Simmonds *et al.* 1999). Enfin, l'acide 5-aminosalicylique et le balsalazide sont aussi puissants dans les cellules que dans les biopsies (Simmonds *et al.* 1999). Nous pouvons donc imaginer que suivant l'état du patient (phases aiguë, post-aiguë ou rémission), l'efficacité d'un antioxydant peut varier grandement.

On ne connaît encore pas tous les antioxydants efficaces contenus dans les aliments. On ignore encore plus quelles sont les synergies existantes entre les molécules

antioxydantes. Quoiqu'il en soit, pour fournir les antioxydants de manière équilibrée, il semble donc que l'utilisation de fruits et de légumes soit théoriquement la manière idéale. Cependant, certains fruits et légumes peuvent aussi provoquer des flatulences et des gaz abdominaux (annexe 15). Il est donc important de choisir de manière judicieuse les fruits et les légumes afin qu'ils soient tolérés par le patient. Les diététistes et les nutritionnistes devraient donc considérer la tolérance individuelle du patient. Une autre source d'antioxydants actifs au niveau de l'intégrité de la barrière intestinale est l'huile d'olive (Manna *et al.* 1997). Cela est intéressant, car aucune information n'est apportée dans la littérature sur son efficacité dans ces pathologies. D'autant plus que l'on sait maintenant que lors d'un diabète induit par la streptozotocine, l'huile d'olive augmente l'activité de la glutathion-S-transférase au niveau jéjunal (Kakkar *et al.* 1995). Cette huile peut donc non seulement amener des antioxydants, mais aussi augmenter la force des antioxydants endogènes. L'huile d'olive est souvent utilisée comme « groupe » témoin lors de tests réalisés sur certaines huiles, comme les huiles de poissons (Greenfield *et al.* 1993, Hawthorne *et al.* 1992). Une étude a observé les effets de l'huile d'olive, mais uniquement au niveau de l'incorporation des acides gras dans les lipides et de la synthèse d'eicosanoïdes dans la muqueuse du colon de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (Hillier *et al.* 1991). Il serait donc intéressant de tester l'effet antioxydant de l'huile d'olive au niveau d'une étude clinique, en tenant tout de même compte de la présence de stéatorrhées chez les patients (on peut contourner ce problème en donnant l'huile le matin par la forte présence de sels biliaires à cette période, ou en utilisant des suppléments d'enzymes pancréatiques). Pour cette étude, il faudrait prendre une huile d'olive riche en polyphénols, c'est-à-dire dont le traitement n'a pas détruit une grande partie de ceux-ci, et regarder les effets antioxydants et la protection de la barrière intestinale contre les attaques radicalaires.

Cela nous amène logiquement à aborder le thème des huiles de poissons. Il a été démontré que les acides gras polyinsaturés n-3 diminuent l'apparition des sténoses, améliorent la récupération de la muqueuse (évaluation clinique et histologique des biopsies de muqueuses), diminuent l'activité cytotoxique des cellules NK, diminuent le nombre de cellules CD16+ et CD56+ circulantes et diminuent les niveaux de PGE2 et LTB4 comparé aux acides gras monoinsaturés et aux acides gras polyinsaturés n-6

(Almallah *et al.* 1998, Nieto *et al.* 1998). Ces acides gras polyinsaturés n-3, contrairement aux n-6, sont très utiles pour lutter contre les phénomènes inflammatoires, notamment en diminuant la production de prostaglandines pro-inflammatoires et en augmentant la synthèse de prostaglandines beaucoup moins inflammatoires. Mais, il a été démontré que les acides gras polyinsaturés n-3 diminuaient l'activité de la glutathion transférase, de la glutathion reductase, de la glutathion peroxydase, et de la catalase au niveau intestinal (Nieto *et al.* 1998). D'autres études montrent également que l'apport d'huiles de poissons engendre chez le rat une diminution des niveaux d'antioxydants (l'alpha-tocophérol, l'acide ascorbique et le glutathion, ainsi que l'activité de la glutathion peroxydase sélénium dépendante) au niveau du foie et du plasma (Cho *et al.* 1994, D'Aquino *et al.* 1991, Saito *et al.* 1994 et 1996, Skuladottir *et al.* 1994). Cela a également été démontré récemment chez l'humain où l'on peut observer une augmentation des niveaux plasmatique des marqueurs de peroxydation lipidique, ainsi qu'une diminution des niveaux de glutathion réduit et de β -carotène, sans modification des niveaux de vitamine E (Foulon *et al.* 1999). Certaines études rapportent le contraire, puisqu'elles augmenteraient l'activité de la catalase, de la glutathion peroxydase et de la Cu-Zn-SOD dans le foie par rapport à une diète riche en acide oléique (Ruiz-Gutierrez *et al.* 1999). Aucune différence n'a été observée dans l'activité de la NADPH-cytochrome c reductase (Ruiz-Gutierrez *et al.* 1999). Les huiles de poissons seraient aussi capables d'induire l'activité de la glutathion reductase, de la glutathion peroxydase, de la glutathion-S-transférase et de la catalase au niveau de l'intestin grêle soumis à un stress oxydant induit par l'éthanol chez le rat, mais cela semble être un phénomène adaptatif à une augmentation de la peroxydation lipidique (Kaur *et al.* 1998). Kakkar *et al.* (1995) démontrent, quant à eux, que les huiles de poissons induisent l'augmentation de l'activité de la glutathion-S-transférase, mais uniquement au niveau du jéjunum. D'autres études sont nécessaires pour confirmer si les huiles de poissons favorisent la défense antioxydante ou au contraire la réduisent.

Quoiqu'il en soit, on peut observer en parallèle une augmentation des niveaux de MDA suite à l'ingestion d'huiles de poissons, démontrant une augmentation de la susceptibilité à la peroxydation lipidique (D'Aquino *et al.* 1991, Kubo *et al.* 1997, Saito *et al.* 1994 et 1996, Skuladottir *et al.* 1994). L'explication de ce phénomène repose sur le

fait que les huiles de poissons sont riches en acides gras polyinsaturés (n-3), connus pour être plus sensibles au stress oxydant que les autres acides gras. Cela pourrait peut-être expliquer pourquoi l'ajout d'huile de poissons augmente la susceptibilité des membranes biologiques à la peroxydation lipidique (Garrido *et al.* 1989). Une autre explication repose sur le fait que les acides gras à longue chaîne sont dirigés préférentiellement vers les peroxysomes pour subir la β -oxydation. Lors de la première étape de la β -oxydation dans la mitochondrie, l'acyl CoA est oxydé par l'acyl CoA deshydrogénase et fait intervenir le FAD (flavine adénine dinucléotide oxydée) qui va capter les protons et entrer dans la chaîne respiratoire pour donner 2 ATP. Par contre, dans le peroxysome, l'acyl CoA est oxydé par l'acyl CoA oxydase et les protons seront transmis par le FAD à une molécule d'oxygène, engendrant ainsi du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, une augmentation de l'apport d'acides gras à longue chaîne, comme il en a dans les huiles de poissons, pourrait augmenter la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Saito *et al.* (1996) ont émis l'idée de ne pas dépasser 1 % de l'apport énergétique total en acide docosahexaénoïque pour éviter les méfaits induits par cet acide gras polyinsaturés n-3 tout en conservant ses avantages. L'ajout d'antioxydants en complément des huiles de poissons pourrait certainement être important pour contrer la peroxydation lipidique induite par les huiles de poissons.

L'efficacité de mélanger des huiles de poissons, des oligosaccharides non-digestibles, de la gomme arabique et des antioxydants chez le cochon a déjà été démontrée. En effet, on peut noter une diminution des niveaux de thromboxane B2 et du 6-keto-prostaglandin F1 alpha (Campbell *et al.* 1997). On connaît déjà l'importance des acides gras polyinsaturés n-3 comme l'EPA (acide eicosapentaénoïque) et le DHA (acide docosahexaénoïque) pour lutter contre l'inflammation, car ils permettent d'engendrer des prostaglandines moins inflammatoires que celles que l'on pourrait obtenir avec des acides gras comme l'acide arachidonique. C'est un élément intéressant à prendre en compte, car cela démontre l'utilité et la complémentarité des différents aliments et molécules dans la lutte contre les méfaits de l'inflammation intestinale. Même si certaines études démontrent le peu d'efficacité de ces molécules prises seules, il semble exister une synergie entre celles-ci. Les maladies inflammatoires de l'intestin impliquent plusieurs mécanismes, plus ou moins liés entre eux. Cela explique peut-être

pourquoi l'utilisation simultanée de différentes molécules, avec leurs avantages propres, est souvent plus efficace.

Les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin souffrent souvent de malnutrition. Même si l'on sait que la malnutrition s'installe après la progression de la maladie, il est difficile de faire la part entre les désordres nutritionnels induits par la pathologie et ceux induits par la malnutrition. Nous pouvons citer en exemple le cas des acides gras polyinsaturés n-3, dont les niveaux sériques sont diminués chez des patients souffrant de la maladie de Crohn (Kuroki *et al.* 1997). Est-ce que la déficience en n-3 fait que le terrain est plus propice à la synthèse d'agents pro-inflammatoires et favorise l'apparition de la maladie, ou est-ce la maladie qui provoque la déficience en n-3 et exacerbe l'inflammation ? Ceci reste encore à démontrer.

Quoiqu'il en soit, l'ajout d'antioxydants dans l'alimentation devrait être un complément au traitement des personnes souffrant de maladies inflammatoires de l'intestin. En effet, on se rend de plus en plus compte qu'une alimentation élémentaire permet de favoriser la rémission du patient dans plus de 90% des cas (Hunter 1998), et cela implique très certainement les nombreuses molécules antioxydantes présentes dans cette alimentation, et surtout la synergie avec d'autres molécules présentes.

L'étude que nous venons de mener montre donc pour la première fois que les cellules Caco-2 soumises à un stress oxydant, induit par un système fer/ascorbate, ont une capacité d'estérification des lipides et de synthèse de certaines apolipoprotéines (B48, AIV et AI) diminuée. Par contre, un accroissement de la synthèse du cholestérol apparaît, qui s'explique par une augmentation de l'activité de l'enzyme HMG-CoA réductase. Ces effets observés au niveau cellulaire se répercutent au niveau circulatoire (basolatéral), car la sécrétion des lipides estérifiés et des apolipoprotéines (B100, B48, AIV) est diminuée. La sécrétion de cholestérol par les cellules suit aussi ce que l'on peut observer dans les cellules, c'est-à-dire une augmentation. Enfin, la sécrétion des différentes lipoprotéines par ces cellules (chylomicrons, VLDL, LDL, HDL) est affectée.

Lorsque l'on ajoute un antioxydant assez puissant (le BHT) pour contrer la peroxydation lipidique induite par le fer/ascorbate, l'ensemble des effets observés au niveau cellulaire sont corrigés. Cependant, au niveau basolatéral, le BHT n'arrive pas à corriger en totalité la diminution de la sécrétion des lipides estérifiés, des apolipoprotéines et des lipoprotéines (chylomicrons, VLDL, HDL), même si une nette amélioration est observée, ce qui démontre une actions directe du fer.

Afin de pouvoir comprendre quelle est l'implication de la peroxydation lipidique dans les phénomènes inflammatoires intestinaux, l'effet des lipopolysaccharides et du fer/ascorbate a été étudié sur l'intégrité de la barrière mucoale intestinale et sur l'activité de la cyclooxygénase-2 (COX-2). Nous avons pu ainsi voir que le système fer/ascorbate/lipopolysaccharides est capable de provoquer une peroxydation lipidique, d'altérer la viabilité de la barrière mucoale intestinale (diminution de la fluidité membranaire et augmentation de la perméabilité paracellulaire) et d'augmenter l'expression et l'activité de COX-2. L'ajout de butyrate et de BHT permet d'inhiber ces effets observés.

L'implication du stress oxydant au niveau intestinal est donc importante et agit à différents niveaux. Il peut diminuer l'absorption des lipides alimentaires, et augmenter l'apparition de facteurs pro-inflammatoires *in vitro*. On sait l'importance des malabsorptions intestinales, notamment lipidiques, dans le cas des maladies

inflammatoires de l'intestin, où l'on voit qu'il existe des niveaux de stress oxydant élevés. On sait également que les méfaits dus à l'inflammation sont nombreux et lourds de conséquences. Peut-être faudrait-il prêter plus d'attention au stress oxydant dans ces pathologies, afin de renforcer l'efficacité des traitements anti-inflammatoires.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* 1999 Apr;20(4):629-34.
- Abrams CK, Hamosh M, Lee TC, Ansher AF, Collen MJ, Lewis JH, Benjamin SB, Hamosh P. Gastric lipase: localization in the human stomach. *Gastroenterology* 1988 Dec;95(6):1460-4.
- Adderley SR, Fitzgerald DJ. Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 1999 Feb 19;274(8):5038-46.
- Alberghina M; Lupo G; Anfuso CD; el Ghonemy SH. Lipid peroxidation inhibits acyl-CoA:1-acyl-sn-glycerol-3-phosphocholine O-acyltransferase but not CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity in rat brain membranes. *Neurochem Int*, 26(5):477-87 1995 May.
- Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, Ash SK. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990 Oct;212(4):496-510; discussion 511-2.
- Almallah YZ, Richardson S, O'Hanrahan T, Mowat NA, Brunt PW, Sinclair TS, Ewen S, Heys SD, Eremin O. Distal procto-colitis, natural cytotoxicity, and essential fatty acids. *Am J Gastroenterol* 1998 May;93(5):804-9.
- Alvarez-Hernandez X, Nichols GM, Glass J. Caco-2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers. *Biochim Biophys Acta* 1991 Nov 18;1070(1):205-8.
- Anfuso CD; Lupo G; Sipione S; Alberghina M . Susceptibility of rat retina acyl-CoA:1-acyl-sn-glycerol-3-phosphocholine O-acyltransferase and CTP:phosphocholine cytidyltransferase activity to lipid peroxidation and hydroperoxide treatment. *FEBS Lett*, 347(2-3):123-7 1994 Jun 27.
- Anup R, Aparna V, Pulimood A, Balasubramanian KA. Surgical stress and the small intestine: role of oxygen free radicals. *Surgery* 1999 May;125(5):560-9.
- Anup R, Madesh M, Balasubramanian KA. Enterocyte mitochondrial dysfunction due to oxidative stress. *Indian J Biochem Biophys* 1999 Aug;36(4):266-71.

- Artursson P, Magnusson C. Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs of different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 1990 Jul;79(7):595-600.
- Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* 1990 Jun;79(6):476-82.
- Aruoma OI, Evans PJ, Kaur H, Sutcliffe L, Halliwell B. An evaluation of the antioxidant and potential pro-oxidant properties of food additives and of trolox C, vitamin E and probucol. *Free Radic Res Commun* 1990;10(3):143-57.
- Aruoma OI, Halliwell B. The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. *Xenobiotica* 1988 Apr;18(4):459-70.
- Aw TY, Rhoads CA. Glucose regulation of hydroperoxide metabolism in rat intestinal cells. Stimulation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate supply. *J Clin Invest* 1994 Dec;94(6):2426-34.
- Aw TY, Williams MW, Gray L. Absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids by rat small intestine in vivo: role of mucosal GSH. *Am J Physiol* 1992a Jan;262(1 Pt 1):G99-106.
- Aw TY, Williams MW. Intestinal absorption and lymphatic transport of peroxidized lipids in rats: effect of exogenous GSH. *Am J Physiol* 1992b Nov;263(5 Pt 1):G665-72.
- Aw TY. Biliary glutathione promotes the mucosal metabolism of luminal peroxidized lipids by rat small intestine in vivo. *J Clin Invest* 1994 Sep;94(3):1218-25.
- Aw TY. Molecular and cellular responses to oxidative stress and changes in oxidation-reduction imbalance in the intestine. *Am J Clin Nutr* 1999 Oct;70(4):557-65.
- Awad AB, Horvath PJ, Andersen MS. Influence of butyrate on lipid metabolism, survival, and differentiation of colon cancer cells. *Nutr Cancer* 1991;16(2):125-33.

- Azzi A, Aratri E, Boscoboinik D, Clement S, Ozer NK, Ricciarelli R, Spycher S. Molecular basis of alpha-tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. *Biofactors* 1998;7(1-2):3-14.
- Babbs CF. Oxygen radicals in ulcerative colitis. *Free Radic Biol Med* 1992;13(2):169-81.
- Babidge W, Millard S, Roediger W. Sulfides impair short chain fatty acid beta-oxidation at acyl-CoA dehydrogenase level in colonocytes: implications for ulcerative colitis. *Mol Cell Biochem* 1998 Apr;181(1-2):117-24.
- Bacon BR, Britton RS. The pathology of hepatic iron overload : A free radical-mediated process ? *Hepatology* 1990;11:127-137.
- Bacon BR, Brown KE. Iron metabolism and disorders of iron overload. In: *Liver and Biliary Diseases*, edited by Kaplowitz N. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996;349-362.
- Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1991 Apr 16;1072(1):63-80.
- Bagchi D, Carryl OR, Tran MX, Bagchi M, Garg A, Milnes MM, Williams CB, Balmoori J, Bagchi DJ, Mitra S, Stohs SJ. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *Mol Cell Biochem* 1999 Jun;196(1-2):109-16.
- Bagchi D, Carryl OR, Tran MX, Krohn RL, Bagchi DJ, Garg A, Bagchi M, Mitra S, Stohs SJ. Stress, diet and alcohol-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate. *J Appl Toxicol* 1998 Jan-Feb;18(1):3-13.
- Baker RD Jr, Baker SS, Rao R. Selenium deficiency in tissue culture: implications for oxidative metabolism. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998 Oct;27(4):387-92.
- Baker RD, Baker SS, LaRosa K. Polarized Caco-2 cells. Effect of reactive oxygen metabolites on enterocyte barrier function. *Dig Dis Sci* 1995 Mar;40(3):510-8.
- Baker SS, Baker RD Jr. Antioxidant enzymes in the differentiated Caco-2 cell line. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992 Sep-Oct;28A(9-10):643-7.
- Baker SS, Campbell CL. Rat enterocyte injury by oxygen-dependent processes. *Gastroenterology* 1991 Sep;101(3):716-20.

- Banan A, Choudhary S, Zhang Y, Fields JZ, Keshavarzian A. Ethanol-induced barrier dysfunction and its prevention by growth factors in human intestinal monolayers: evidence for oxidative and cytoskeletal mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 1999 Dec;291(3):1075-85.
- Barchowsky A, Munro SR, Morana SJ, Vincenti MP, Treadwell M. Oxidant-sensitive and phosphorylation-dependent activation of NF-kappa B and AP-1 in endothelial cells. *Am J Physiol* 1995 Dec;269(6 Pt 1):L829-36.
- Barja G, Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Prat J, Pamplona R. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radic Biol Med* 1994 Aug;17(2):105-15.
- Bartfay WJ, Butany J, Lehotay DC, Sole MJ, Hou D, Bartfay E, Liu PP. A biochemical, histochemical, and electron microscopic study on the effects of iron-loading on the hearts of mice. *Cardiovasc Pathol* 1999 Nov-Dec;8(6):305-14.
- Bass NM, Manning JA, Ockner RK, Gordon JI, Seetharam S, Alpers DH. Regulation of the biosynthesis of two distinct fatty acid-binding proteins in rat liver and intestine. Influences of sex difference and of clofibrate. *J Biol Chem* 1985a Feb 10;260(3):1432-6.
- Bass NM, Manning JA, Ockner RK. Turnover and short-term regulation of fatty acid binding protein in liver. *J Biol Chem* 1985b Aug 15;260(17):9603-7.
- Basson MD, Hong F. Tyrosine kinase inhibitors reverse butyrate stimulation of human Caco-2 intestinal epithelial cell alkaline phosphatase but not butyrate promotion of dipeptidyl dipeptidase. *Cell Biol Int* 1998;22(5):339-44.
- Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med*. 1991 Sep 30;91(3C):2S-13S.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Feb;87(4):1620-4.
- Bellomo G, Jewell SA, Thor H, Orrenius S. Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982 Nov;79(22):6842-6.

- Benard O, Balasubramanian KA. Effect of oxidized glutathione on intestinal mitochondria and brush border membrane. *Int J Biochem Cell Biol* 1995 Jun;27(6):589-95.
- Berger NA. Oxidant-induced cytotoxicity: a challenge for metabolic modulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991 Jan;4(1):1-3.
- Berger TM, Polidori MC, Dabbagh A, Evans PJ, Halliwell B, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Frei B. Antioxidant activity of vitamin C in iron-overloaded human plasma. *J Biol Chem* 1997 Jun 20;272(25):15656-60.
- Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997 Aug 15;272(33):20313-6.
- Bernback S, Hernell O, Blackberg L. Bovine pregastric lipase: a model for the human enzyme with respect to properties relevant to its site of action. *Biochim Biophys Acta* 1987 Nov 21;922(2):206-13.
- Bielefeldt K, Conklin JL. Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Dig Dis Sci* 1997 May;42(5):878-84.
- Bielefeldt K, Whiteis CA, Sharma RV, Abboud FM, Conklin JL. Reactive oxygen species and calcium homeostasis in cultured human intestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997 Jun;272(6 Pt 1):G1439-50.
- Bielski BH, Richter HW, Chan PC. Some properties of the ascorbate free radical. *Ann N Y Acad Sci* 1975 Sep 30;258:231-7.
- Biemond P, van Eijk HG, Swaak AJ, Koster JF. Iron mobilization from ferritin by superoxide derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Possible mechanism in inflammation diseases. *J Clin Invest* 1984 Jun;73(6):1576-9.
- Blackberg L, Hernell O, Olivecrona T. Hydrolysis of human milk fat globules by pancreatic lipase: role of colipase, phospholipase A2, and bile salts. *J Clin Invest* 1981 Jun;67(6):1748-52.

- Blais A, Bissonnette P, Berteloot A. Common characteristics for Na⁺-dependent sugar transport in Caco-2 cells and human fetal colon. *J Membr Biol* 1987;99(2):113-25.
- Blau S, Rubinstein A, Bass P, Singaram C, Kohen R. Differences in the reducing power along the rat GI tract: lower antioxidant capacity of the colon. *Mol Cell Biochem* 1999 Apr;194(1-2):185-91.
- Borgstrom B. Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A₂, and fatty acid for the digestion of dietary fat: in vitro experiments with the porcine enzymes. *Gastroenterology* 1980 May;78(5 Pt 1):954-62.
- Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991 Apr 5;266(10):6188-94.
- Boveries A, Oshino N, Cance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1972;128:617-630.
- Breslow JL. Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation. *Annu Rev Biochem* 1985;54:699-727.
- Brigelius-Flohé R; Traber MG . Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*, 13(10):1145-55 1999 Jul .
- Brindley DN, Hubscher G. The intracellular distribution of the enzymes catalysing the biosynthesis of glycerides in the intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta* 1965 Dec 2;106(3):495-509.
- Brown JF, Tepperman BL. Ontogeny of nitric oxide synthase activity and endotoxin-mediated damage in the neonatal rat colon. *Pediatr Res* 1997 May;41(5):635-40.
- Brunet S, Thibault L, Delvin E, Yotov W, Bendayan M, Levy E. Dietary iron overload and induced lipid peroxidation are associated with impaired plasma lipid transport and hepatic sterol metabolism in rats. *Hepatology* 1999 Jun;29(6):1809-17.
- Brunet S, Thibault L, Lepage G, Seidman EG, Dube N, Levy E. Modulation of endoplasmic reticulum-bound cholesterol regulatory enzymes by iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 2000 Jan 1;28(1):46-54.
- Buettner GR, Jurkiewicz BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* 1996 May;145(5):532-41.

- Buettner GR, Saran M, Bors W. The kinetics of the reaction of ferritin with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1987;2(4-6):369-72.
- Buffinton GD, Doe WF. Altered ascorbic acid status in the mucosa from inflammatory bowel disease patients. *Free Radic Res* 1995a Feb;22(2):131-43.
- Buffinton GD, Doe WF. Depleted mucosal antioxidant defences in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 1995b Dec;19(6):911-8.
- Buranaprapuk A, Leach SP, Kumar CV, Bocarsly JR. Protein cleavage by transition metal complexes bearing amino acid substituents. *Biochim Biophys Acta* 1998 Sep 8;1387(1-2):309-16.
- Burke A, Lichtenstein GR, Rombeau JL. Nutritional and metabolic advances in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998 Sep;1(5):387-90.
- Caddell JL. A review of evidence for a role of magnesium and possibly copper deficiency in necrotizing enterocolitis. *Magnes Res* 1996 Mar;9(1):55-66.
- Cadenas S, Rojas C, Barja G. Endotoxin increases oxidative injury to proteins in guinea pig liver: protection by dietary vitamin C. *Pharmacol Toxicol* 1998 Jan;82(1):11-8.
- Campbell JM, Fahey GC Jr, Lichtensteiger CA, Demichele SJ, Garleb KA. An enteral formula containing fish oil, indigestible oligosaccharides, gum arabic and antioxidants affects plasma and colonic phospholipid fatty acid and prostaglandin profiles in pigs. *J Nutr* 1997 Jan;127(1):137-45.
- Canesi L, Ciacci C, Piccoli G, Stocchi V, Viarengo A, Gallo G. In vitro and in vivo effects of heavy metals on mussel digestive gland hexokinase activity: the role of glutathione. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1998 Aug;120(2):261-8.
- Carey MC, Small DM, Bliss CM. Lipid digestion and absorption. *Annu Rev Physiol* 1983;45:651-77.
- Carr A; Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J*, 13(9):1007-24 1999 Jun.
- Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry D, Maier RV. Multiple-organ-failure syndrome. *Arch Surg* 1986 Feb;121(2):196-208.

- Cartwright IJ; Higgins JA. Molecular and intracellular events in the assembly and secretion of chylomicrons by enterocytes. *Biochem Soc Trans*, 26(2):211-6 1998 May .
- Catala A, Arcemis C, Cerruti A. Interaction of rat liver microsomes containing saturated or unsaturated fatty acids with fatty acid binding protein: peroxidation effect. *Mol Cell Biochem* 1994 Aug 31;137(2):135-9.
- Cepinskas G, Kvietys PR, Aw TY. Omega 3-lipid peroxides injure CaCo-2 cells: relationship to the development of reduced glutathione antioxidant systems. *Gastroenterology* 1994 Jul;107(1):80-6.
- Cerutti PA. Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur J Clin Invest* 1991 Feb;21(1):1-5.
- Chamulitrat W, Skrepnik NV, Spitzer JJ. Endotoxin-induced oxidative stress in the rat small intestine: role of nitric oxide. *Shock* 1996a Mar;5(3):217-22.
- Chamulitrat W, Skrepnik NV, Spitzer JJ. Nitrosyl complex formation during endotoxin-induced injury in the rat small intestine. *Shock* 1996b Jan;5(1):59-65.
- Chan AC, Wagner M, Kennedy C, Mroske C, Proulx P, Laneville O, Tran K, Choy PC. Vitamine E up-regulates phospholipase A2, arachidonic acid release and cyclooxygenase in endothelial cells. *Akt Ernahr Med* 1998 (23):1-8.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979 Jul;59(3):527-605.
- Chanderbhan R, Noland BJ, Scallen TJ, Vahouny GV. Sterol carrier protein2. Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. *J Biol Chem* 1982 Aug 10;257(15):8928-34.
- Chen X, Ding YW, Yang Gy, Bondoc F, Lee MJ, Yang CS. Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* 2000 Feb;21(2):257-63.
- Cho SH, Choi YS. Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids* 1994 Jan;29(1):47-52.
- Christen S, Woodall AA, Shigenaga MK, Southwell-Keely PT, Duncan MW, Ames BN. gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Apr 1;94(7):3217-22.

- Christensen NJ, Rubin CE, Cheung MC, Albers JJ. Ultrastructural immunolocalization of apolipoprotein B within human jejunal absorptive cells. *J Lipid Res* 1983 Sep;24(9):1229-42.
- Christl SU, Eisner HD, Dusel G, Kasper H, Scheppach W. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1996 Dec;41(12):2477-81.
- Cogburn JN, Donovan MG, Schasteen CS. A model of human small intestinal absorptive cells. 1. Transport barrier. *Pharm Res* 1991 Feb;8(2):210-6.
- Coleman JE. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992;21:441-83.
- Collis CS, Yang M, Diplock AT, Hallinan T, Rice-Evans CA. Effects of co-supplementation of iron with ascorbic acid on antioxidant--pro-oxidant balance in the guinea pig. *Free Radic Res* 1997 Jul;27(1):113-21.
- Conley HL Jr, Martin RB. Transition metal ion promoted hydrolyses of amino acid esters. *J Phys Chem* 1965 Sep;69(9):2923-35.
- Cooney RV, Franke AA, Harwood PJ, Hatch-Pigott V, Custer LJ, Mordan LJ. Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Mar 1;90(5):1771-5.
- Cooney RV, Harwood PJ, Franke AA, Narala K, Sundstrom AK, Berggren PO, Mordan LJ. Products of gamma-tocopherol reaction with NO₂ and their formation in rat insulinoma (RINm5F) cells. *Free Radic Biol Med* 1995 Sep;19(3):259-69.
- Crichton RR, Charloteaux-Wauters M. Iron transport and storage. *Eur J Biochem* 1987 May 4;164(3):485-506.
- Cross CE, Halliwell B, Allen A. Antioxidant protection: a function of tracheobronchial and gastrointestinal mucus. *Lancet* 1984 Jun 16;1(8390):1328-30.
- Cruz T, Galvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sanchez de Medina L -H F, Zarzuelo A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci* 1998;62(7):687-95.

- Czerniak B, Herz F, Wersto RP, Koss LG. Modification of Ha-ras oncogene p21 expression and cell cycle progression in the human colonic cancer cell line HT-29. *Cancer Res* 1987 Jun 1;47(11):2826-30.
- D'Aquino M, Benedetti PC, Di Felice M, Gentili V, Tomassi G, Maiorino M, Ursini F. Effect of fish oil and coconut oil on antioxidant defence system and lipid peroxidation in rat liver. *Free Radic Res Commun* 1991;12-13 Pt 1:147-52.
- Darmon N, Pelissier MA, Heyman M, Albrecht R, Desjeux JF. Oxidative stress may contribute to the intestinal dysfunction of weanling rats fed a low protein diet. *J Nutr* 1993 Jun;123(6):1068-75.
- Das D, Bandyopadhyay D, Banerjee RK. Oxidative inactivation of gastric peroxidase by site-specific generation of hydroxyl radical and its role in stress-induced gastric ulceration. *Free Radic Biol Med* 1998 Feb;24(3):460-9.
- Dasgupta A, Zdunek T. In vitro lipid peroxidation of human serum catalyzed by cupric ion: antioxidant rather than prooxidant role of ascorbate. *Life Sci* 1992;50(12):875-82.
- Dashti N, Smith EA, Alaupovic P. Increased production of apolipoprotein B and its lipoproteins by oleic acid in Caco-2 cells. *J Lipid Res* 1990 Jan;31(1):113-23.
- de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 1999 Jan;26(1-2):202-26.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997 May 15;324 (Pt 1):1-18.
- Dean RT, Roberts CR, Forni LG. Oxygen-centred free radicals can efficiently degrade the polypeptide of proteoglycans in whole cartilage. *Biosci Rep* 1984 Dec;4(12):1017-26.
- Deitch EA, Haskel Y, Cruz N, Xu D, Kvietys PR. Caco-2 and IEC-18 intestinal epithelial cells exert bactericidal activity through an oxidant-dependent pathway. *Shock* 1995 Nov;4(5):345-50.
- Deitch EA, Ma L, Ma WJ, Grisham MB, Granger DN, Specian RD, Berg RD. Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice. *J Clin Invest* 1989 Jul;84(1):36-42.

- Demigne C, Fafournoux P, Remesy C. Enhanced uptake of insulin and glucagon by liver in rats adapted to a high protein diet. *J Nutr* 1985 Aug;115(8):1065-72.
- Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 1994;63:915-48.
- Den Hond E, Hiele M, Evenepoel P, Peeters M, Ghos Y, Rutgeerts P. In vivo butyrate metabolism and colonic permeability in extensive ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1998 Sep;115(3):584-90
- Devaraj S, Li D, Jialal . The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Decreased lipid oxidation, interleukin 1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium. *J Clin Invest* 1996 Aug 1;98(3):756-63.
- Devaux PF. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 1991 Feb 5;30(5):1163-73.
- Dijkstra BW, Drenth J, Kalk KH. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A2. *Nature* 1981 Feb 12;289(5798):604-6.
- Dix CJ, Hassan IF, Obray HY, Shah R, Wilson G. The transport of vitamin B12 through polarized monolayers of Caco-2 cells. *Gastroenterology* 1990 May;98(5 Pt 1):1272-9.
- Donner J, Spink CH, Borgstrom B, Sjolholm I. Interactions between pancreatic lipase, co-lipase, and taurodeoxycholate in the absence of triglyceride substrate. *Biochemistry* 1976 Nov 30;15(24):5413-7.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998 Sep;12(12):1063-73.
- Dudeja PK, Brasitus TA. Inactivation of rat small intestinal brush-border membrane alkaline phosphatase by oxygen free radicals. *Gastroenterology* 1993 Aug;105(2):357-66.
- Duffy MM, Regan MC, Ravichandran P, O'Keane C, Harrington MG, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Mucosal metabolism in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 1998 Nov;41(11):1399-405.

- Duthie SJ, Andrew RC. The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. *Free Radical Biology & Medicine* 1997;22(4):717-724.
- Duthie SJ, Dobson VL. Dietary flavonoids protect human colonocyte DNA from oxidative attack in vitro. *Eur J Nutr* 1999 Feb;38(1):28-34.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994 Oct;107(4):1183-8.
- Ek BA, Cistola DP, Hamilton JA, Kaduce TL, Spector AA. Fatty acid binding proteins reduce 15-lipoxygenase-induced oxygenation of linoleic acid and arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* 1997 May 17;1346(1):75-85.
- Elstner EF. Oxygen radicals--biochemical basis for their efficacy. *Klin Wochenschr* 1991 Dec 15;69(21-23):949-56.
- Engler JA, Gupta A, Li L, Rao RK. Inhibition of DNA synthesis in Caco-2 cells by oxidative stress: amelioration by epidermal growth factor. *Dig Dis Sci* 1999 Sep;44(9):1902-9.
- Farber JL, Kyle ME, Coleman JB. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest* 1990;62:670-679.
- Feldman EB, Russell BS, Chen R, Johnson J, Forte T, Clark SB. Dietary saturated fatty acid content affects lymph lipoproteins: studies in the rat. *J Lipid Res* 1983 Aug;24(8):967-76.
- Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 1995 Apr;95(4):1669-75.
- Fernandez-Banares F, Hinojosa J, Sanchez-Lombrana JL, Navarro E, Martinez-Salmeron JF, Garcia-Puges A, Gonzalez-Huix F, Riera J, Gonzalez-Lara V, Dominguez-Abascal F, Gine JJ, Moles J, Gomollon F, Gassull MA. Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU). *Am J Gastroenterol* 1999 Feb;94(2):427-33.

- Ferrari R, Alfieri O, Curello S, Ceconi C, Cargnoni A, Marzollo P, Pardini A, Caradonna E, Visioli. Occurrence of oxidative stress during reperfusion of the human heart. *Circulation* 1990;81:201-211.
- Field F, Jeffrey, Born Ella, Murthy Shubha, and Mathur Satya N. Caveolin is present in intestinal cells: role in cholesterol trafficking? *J. Lipid Res.* 1998a. 39: 1938-1950.
- Field FJ, Albright E, Mathur SN. Regulation of cholesterol esterification by micellar cholesterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 1987 Sep;28(9):1057-66.
- Field FJ, Born E, Chen H, Murthy S, Mathur SN. Lysophosphatidylcholine increases the secretion of cholesteryl ester-poor triacylglycerol-rich lipoproteins by CaCo-2 cells. *Biochem J* 1994 Nov 15;304 (Pt 1):35-42.
- Field FJ, Born E, Mathur SN : Effect of micellar beta-sitosterol on cholesterol metabolism in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 1997 Feb;38(2):348-60.
- Field FJ, Born E, Mathur SN : Triacylglycerol-rich lipoprotein cholesterol is derived from the plasma membrane in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 1995 Dec;36(12):2651-60.
- Field FJ, Chen H, Born E, Dixon B, Mathur S. Release of ceramide after membrane sphingomyelin hydrolysis decreases the basolateral secretion of triacylglycerol and apolipoprotein B in cultured human intestinal cells. *J Clin Invest* 1993 Dec;92(6):2609-19.
- Field FJ, Fujiwara D, Born E, Chappell DA, Mathur SN. Regulation of LDL receptor expression by luminal sterol flux in CaCo-2 cells. *Arterioscler Thromb* 1993 May;13(5):729-37.
- Field FJ, Henning B, Mathur SN. In vitro regulation of 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A reductase and acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activities by phosphorylation-dephosphorylation in rabbit intestine. *Biochim Biophys Acta* 1984a Nov 6;802(1):9-16
- Field FJ, Shreves T, Fujiwara D, Murthy S, Albright E, Mathur SN. Regulation of gene expression and synthesis and degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by micellar cholesterol in CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 1991 Nov;32(11):1811-21.

- Field FJ. Intestinal cholesterol esterase: intracellular enzyme or contamination of cytosol by pancreatic enzymes? *J Lipid Res* 1984b Apr;25(4):389-99.
- Field FJ; Albright E; Mathur S. Inhibition of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity by PD128042: effect on cholesterol metabolism and secretion in CaCo-2 cells. *Lipids*, 26(1):1-8 1991 Jan.
- Field FJ; Born E; Murthy S; Mathur SN. Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane is constitutive in CaCo-2 cells and differs from the transport of plasma membrane cholesterol to the endoplasmic reticulum. *J Lipid Res*, 39(2):333-43 1998b Feb.
- Field FJ; Erickson SK; Shrewsbury MA; Cooper AD. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat intestine: subcellular localization and in vitro regulation. *J Lipid Res*, 23(1):105-13 1982 Jan.
- Field FJ; Kam NT; Mathur SN. Regulation of cholesterol metabolism in the intestine. *Gastroenterology*, 99(2):539-51 1990 Aug
- Fischer EH, Charbonneau H, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* 1991 Jul 26;253(5018):401-6.
- Flohe L, Schlegel W. Glutathione peroxidase. IV. Intracellular distribution of the glutathione peroxidase system in the rat liver. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1971 Oct;352(10):1401-10.
- Fodor I, Marx JJ. Lipid peroxidation of rabbit small intestinal microvillus membrane vesicles by iron complexes. *Biochim Biophys Acta* 1988 Jul 1;961(1):96-102.
- Folco GC. New NSAIDs and gastroduodenal damage. *Ital J Gastroenterol* 1996 Dec;28 Suppl 4:28-9.
- Foulon T, Richard MJ, Payen N, Bourrain JL, Beani JC, Laporte F, Hadjian A. Effects of fish oil fatty acids on plasma lipids and lipoproteins and oxidant-antioxidant imbalance in healthy subjects. *Scand J Clin Lab Invest* 1999 Jul;59(4):239-48.
- Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J, Keaney JF Jr. alpha-tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation* 1996 Nov 15;94(10):2434-40.

- Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 1989 May 15;264(14):7761-4.
- Gallo LL, Clark SB, Myers S, Vahouny GV. Cholesterol absorption in rat intestine: role of cholesterol esterase and acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* 1984 Jun;25(6):604-12.
- Ganesh Pai C, Sreejayan, Rao MN. Evidence for oxidant stress in chronic pancreatitis. *Indian J Gastroenterol* 1999 Oct-Nov;18(4):156-7.
- Gantchev TG, van Lier JE. Catalase inactivation following photosensitization with tetrasulfonated metallophthalocyanines. *Photochem Photobiol* 1995 Jul;62(1):123-34.
- Garcia-Morales P, Minami Y, Luong E, Klausner RD, Samelson LE. Tyrosine phosphorylation in T cells is regulated by phosphatase activity: studies with phenylarsine oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Dec;87(23):9255-9.
- Gargouri Y, Moreau H, Verger R. Gastric lipases: biochemical and physiological studies. *Biochim Biophys Acta* 1989 Dec 18;1006(3):255-71.
- Garrido A, Garrido F, Guerra R, Valenzuela A. Ingestion of high doses of fish oil increases the susceptibility of cellular membranes to the induction of oxidative stress. *Lipids* 1989 Sep;24(9):833-5.
- Gavey KL, Trujillo DL, Scallen TJ. Evidence for phosphorylation/dephosphorylation of rat liver acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 Apr;80(8):2171-4.
- Gebhard RL, Stone BG, Prigge WF. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in the human gastrointestinal tract. *J Lipid Res* 1985 Jan;26(1):47-53.
- Gebhardt BR, Ries J, Caspary WF, Boehles H, Stein J. Superoxide: a major factor for stress protein induction in reoxygenation injury in the intestinal cell line Caco-2. *Digestion* 1999;60(3):238-45.

- Geerling BJ, Badart-Smook A, Stockbrugger RW, Brummer RJ. Comprehensive nutritional status in patients with long-standing Crohn disease currently in remission. *Am J Clin Nutr* 1998 May;67(5):919-26.
- Geerling BJ, v Houwelingen AC, Badart-Smook A, Stockbrugger RW, Brummer RJ. The relation between antioxidant status and alterations in fatty acid profile in patients with Crohn disease and controls. *Scand J Gastroenterol* 1999 Nov;34(11):1108-16.
- Geis GS. Update on clinical developments with celecoxib, a new specific COX-2 inhibitor: what can we expect? *J Rheumatol* 1999 Apr;26 Suppl 56:31-6.
- Genser D, Kang MH, Vogelsang H, Elmadfa I. Status of lipidsoluble antioxidants and TRAP in patients with Crohn's disease and healthy controls. *Eur J Clin Nutr* 1999 Sep;53(9):675-9.
- Giannoni F, Field FJ, Davidson NO. An improved reverse transcription-polymerase chain reaction method to study apolipoprotein gene expression in Caco-2 cells. *J Lipid Res* 1994 Feb;35(2):340-50.
- Gibson P, Rosella O. Interleukin 8 secretion by colonic crypt cells in vitro: response to injury suppressed by butyrate and enhanced in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995 Oct;37(4):536-43.
- Gibson PR, Moeller I, Kagelari O, Folino M, Young GP. Contrasting effects of butyrate on the expression of phenotypic markers of differentiation in neoplastic and non-neoplastic colonic epithelial cells in vitro. *J Gastroenterol Hepatol* 1992 Mar-Apr;7(2):165-72.
- Gibson PR, Rosella O, Wilson AJ, Mariadason JM, Rickard K, Byron K, Barkla DH. Colonic epithelial cell activation and the paradoxical effects of butyrate. *Carcinogenesis* 1999 Apr;20(4):539-44.
- Gille G, Sigler K. Oxidative stress and living cells. *Folia Microbiol (Praha)* 1995;40(2):131-52.
- Giovannini C, Straface E, Modesti D, Coni E, Cantafora A, De Vincenzi M, Malorni W, Masella R. Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL-induced injury in Caco-2 cells. *J Nutr* 1999 Jul;129(7):1269-77.

- Giron MD, Salto R, Gonzalez Y, Giron JA, Nieto N, Periago JL, Suarez MD, Hortelano P. Modulation of hepatic and intestinal glutathione S-transferases and other antioxidant enzymes by dietary lipids in streptozotocin diabetic rats. *Chemosphere* 1999 Jun;38(13):3003-13.
- Girotti AW. Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med* 1985;1(2):87-95.
- Glickman RM, Kirsch K, Isselbacher KJ. Fat absorption during inhibition of protein synthesis: studies of lymph chylomicrons. *J Clin Invest* 1972 Feb;51(2):356-63
- Glickman RM, Perrotto JL, Kirsch K. Intestinal lipoprotein formation: effect of cholchicine. *Gastroenterology* 1976 Mar;70(3):347-52.
- Gonzalez PK, Doctrow SR, Malfroy B, Fink MP. Role of oxidant stress and iron delocalization in acidosis-induced intestinal epithelial hyperpermeability. *Shock* 1997 Aug;8(2):108-14.
- Gooden JM, Lascelles AK. Relative importance of pancreatic lipase and pregastric esterase on lipid absorption in calves 1-2 weeks of age. *Aust J Biol Sci* 1973 Jun;26(3):625-33.
- Gordon JI, Elshourbagy N, Lowe JB, Liao WS, Alpers DH, Taylor JM. Tissue specific expression and developmental regulation of two genes coding for rat fatty acid binding proteins. *J Biol Chem* 1985 Feb 25;260(4):1995-8.
- Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981 Jul;81(1):22-9.
- Green PH, Tall AR, Glickman RM. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1978 Feb;61(2):528-34.
- Greenfield SM, Green AT, Teare JP, Jenkins AP, Punched NA, Ainley CC, Thompson RP. A randomized controlled study of evening primrose oil and fish oil in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1993 Apr;7(2):159-66.
- Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986 Oct;251(4 Pt 1):G567-74.
- Grisham MB, Von Ritter C, Smith BF, Lamont JT, Granger DN. Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. *Am J Physiol* 1987 Jul;253(1 Pt 1):G93-6.

- Grisham MB, Yamada T. Neutrophils, nitrogen oxides, and inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 1992;664:103-15.
- Grover AK, Samson SE, Fomin VP. Peroxide inactivates calcium pumps in pig coronary artery. *Am J Physiol* 1992 Aug;263(2 Pt 2):H537-4.
- Grover AK, Samson SE. Effect of superoxide radical on Ca²⁺ pumps of coronary artery. *Am J Physiol* 1988 Sep;255(3 Pt 1):C297-303.
- Grover AK, Samson SE. Protection of Ca pump of coronary artery against inactivation by superoxide radical. *Am J Physiol* 1989 Mar;256(3 Pt 1):C666-73.
- Gunel E, Caglayan F, Caglayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg* 1998 Oct;33(10):1536-9.
- Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett* 1986 Jun 9;201(2):291-5.
- Hadari YR, Geiger B, Nadiv O, Sabanay I, Roberts CT Jr, LeRoith D, Zick Y. Hepatic tyrosine-phosphorylated proteins identified and localized following in vivo inhibition of protein tyrosine phosphatases: effects of H₂O₂ and vanadate administration into rat livers. *Mol Cell Endocrinol* 1993 Nov;97(1-2):9-17.
- Hague A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha LI, Hart D, Paraskeva C. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer* 1993 Sep 30;55(3):498-505.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992 Jun;119(6):598-620.
- Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*, 2nd ed. Oxford University Press, New York 1991.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Iron and free radicals reactions : two aspects of antioxidant protection. *TIBS* 1986a;11:372-375.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986b May 1;246(2):501-14.

- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
- Halliwell B. Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res* 1996 Nov;25(5):439-54.
- Harris SG, Sabio I, Mayer E, Steinberg MF, Backus JW, Sparks JD, Sparks CE, Smith HC. Extract-specific heterogeneity in high-order complexes containing apolipoprotein B mRNA editing activity and RNA-binding proteins. *J Biol Chem* 1993 Apr 5;268(10):7382-92.
- Haugen R, Norum KR. Coenzyme-A-dependent esterification of cholesterol in rat intestinal mucosa. *Scand J Gastroenterol* 1976;11(6):615-21.
- Hawthorne AB, Daneshmend TK, Hawkey CJ, Belluzzi A, Everitt SJ, Holmes GK, Malkinson C, Shaheen MZ, Willars JE. Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomised controlled trial. *Gut* 1992 Jul;33(7):922-8.
- Hendel J, Nielsen OH. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997 Jul;92(7):1170-3.
- Hidalgo IJ, Borchardt RT. Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2. *Biochim Biophys Acta* 1990a Sep 21;1028(1):25-30.
- Hidalgo IJ, Borchardt RT. Transport of bile acids in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2. *Biochim Biophys Acta* 1990b Jul 20;1035(1):97-103.
- Higashikubo A, Tanaka N, Noda N, Maeda I, Yagi K, Mizoguchi T, Nanri H. Increase in thioredoxin activity of intestinal epithelial cells mediated by oxidative stress. *Biol Pharm Bull* 1999 Sep;22(9):900-3.
- Higgins JA, Barnett RJ. Fine structural localization of acyltransferases. The monoglyceride and -glycerophosphate pathways in intestinal absorptive cells. *J Cell Biol* 1971 Jul;50(1):102-20.

- Hillier K, Jewell R, Dorrell L, Smith CL. Incorporation of fatty acids from fish oil and olive oil into colonic mucosal lipids and effects upon eicosanoid synthesis in inflammatory bowel disease. *Gut* 1991 Oct;32(10):1151-5.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993 Oct 22;75(2):241-51.
- Hoepelman M, Bezemer WA, van Doormalen E, Verhoef J, Marx JJM. Lipid peroxidation of human granulocytes (PMN) and monocytes by iron complexes. *British Journal of Haematologia* 1989;72:584-588.
- Horton JW, Walker PB. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1993 Apr;74(4):1515-20.
- Hughes TE, Ordovas JM, Schaefer EJ. Regulation of intestinal apolipoprotein B synthesis and secretion by Caco-2 cells. Lack of fatty acid effects and control by intracellular calcium ion. *J Biol Chem* 1988 Mar 5;263(7):3425-31.
- Hughes TE, Sasak WV, Ordovas JM, Forte TM, Lamon-Fava S, Schaefer EJ. A novel cell line (Caco-2) for the study of intestinal lipoprotein synthesis. *J Biol Chem* 1987 Mar 15;262(8):3762-7.
- Hunter JO. Nutritional factors in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998 Mar;10(3):235-7.
- Ikeda I, Tanaka K, Sugano M, Vahouny GV, Gallo LL. Discrimination between cholesterol and sitosterol for absorption in rats. *J Lipid Res* 1988a Dec;29(12):1583-91.
- Ikeda I, Tanaka K, Sugano M, Vahouny GV, Gallo LL. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *J Lipid Res* 1988b Dec;29(12):1573-82.
- Inagake M, Yamane T, Kitao Y, Oya K, Matsumoto H, Kikuoka N, Nakatani H, Takahashi T, Nishimura H, Iwashima A. Inhibition of 1,2-dimethylhydrazine-induced oxidative DNA damage by green tea extract in rat. *Jpn J Cancer Res* 1995 Nov;86(11):1106-11.
- Inan C, Kilinc K, Kotiloglu E, Akman HO, Kilic I, Michl J. Antioxidant therapy of cobalt and vitamin E in hemosiderosis. *J Lab Clin Med* 1998 Aug;132(2):157-65.

- Iwakiri R, Rhoads CA, Aw TY. Determinants of hydroperoxide detoxification in diabetic rat intestine: effect of insulin and fasting on the glutathione redox cycle. *Metabolism* 1995 Nov;44(11):1462-8.
- Jiao S, Moberly JB, Schonfeld G. Editing of apolipoprotein B messenger RNA in differentiated Caco-2 cells. *J Lipid Res* 1990 Apr;31(4):695-700.
- Jonas CR, Estivariz CF, Jones DP, Gu LH, Wallace TM, Diaz EE, Pascal RR, Cotsonis GA, Ziegler TR. Keratinocyte growth factor enhances glutathione redox state in rat intestinal mucosa during nutritional repletion. *J Nutr* 1999 Jul;129(7):1278-84.
- Jore D, Ferradini C. Peroxydation lipidique : rôle des radicaux libres et régulation par les vitamines E et C. *Métabolisme, Oxygène et Lipides* 1989 : 125-136.
- Jourd'heuil D, Mehta S, Meddings JB. Hemileaflet susceptibility to oxidative damage in the intestinal brush-border membrane. *Am J Physiol* 1995 Feb;268(2 Pt 1):G260-9.
- Jourd'heuil D, Morise Z, Conner EM, Grisham MB. Oxidants, transcription factors, and intestinal inflammation. *J Clin Gastroenterol* 1997a;25 Suppl 1:S61-72.
- Jourd'heuil D, Morise Z, Conner EM, Kurose I, Grisham MB. Oxidant-regulation of gene expression in the chronically inflamed intestine. *Keio J Med* 1997b Mar;46(1):10-5.
- Jourd'Heuil D, Vaananen P, Meddings JB. Lipid peroxidation of the brush-border membrane: membrane physical properties and glucose transport. *Am J Physiol* 1993 Jun;264(6 Pt 1):G1009-15.
- Kacmaz M, Ozturk HS, Karaayvaz M, Guven C, Durak I. Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion. Effects of an allopurinol plus antioxidant combination. *Can J Surg* 1999 Dec;42(6):427-31.
- Kagan VE, Serbinova EA, Koynova GM, Kitanova SA, Tyurin VA, Stoytchev TS, Quinn PJ, Packer L. Antioxidant action of ubiquinol homologues with different isoprenoid chain length in biomembranes. *Free Radic Biol Med* 1990;9(2):117-26.
- Kakkar R, Kalra J, Mantha SV, Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1995 Oct 18;151(2):113-9.

- Kam NT, Albright E, Mathur SN, Field FJ. Inhibition of acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase activity in CaCo-2 cells results in intracellular triglyceride accumulation. *J Lipid Res* 1989 Mar;30(3):371-7.
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 1996 Jul;31(7):671-701.
- Kaplan MR, Simoni RD. Transport of cholesterol from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *J Cell Biol* 1985 Aug;101(2):446-53.
- Karayalcin SS, Sturbaum CW, Wachsman JT, Cha JH, Powell DW. Hydrogen peroxide stimulates rat colonic prostaglandin production and alters electrolyte transport. *J Clin Invest* 1990 Jul;86(1):60-8.
- Karczewski JM, Peters JG, Noordhoek J. Prevention of oxidant-induced cell death in Caco-2 colon carcinoma cells after inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase and Ca^{2+} chelation: involvement of a common mechanism. *Biochem Pharmacol* 1999 Jan 1;57(1):19-26.
- Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'Neill G. Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 1996 Aug;111(2):445-54.
- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 1995 Jun 15;55(12):2556-9.
- Kass GE, Duddy SK, Orrenius S. Activation of hepatocyte protein kinase C by redox-cycling quinones. *Biochem J* 1989 Jun 1;260(2):499-507.
- Kaur M, Kaur J, Ojha S, Mahmood A. Ethanol effects on lipid peroxidation and glutathione-mediated defense in rat small intestine: role of dietary fats. *Alcohol* 1998 Jan;15(1):65-9.
- Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993;23(1):21-48.
- Khajuria A, Thusu N, Zutshi U, Bedi KL. Piperine modulation of carcinogen induced oxidative stress in intestinal mucosa. *Mol Cell Biochem* 1998 Dec;189(1-2):113-8.

- Kim YS, Tsao D, Siddiqui B, Whitehead JS, Arnstein P, Bennett J, Hicks J. Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells. *Cancer* 1980 Mar 15;45(5 Suppl):1185-92.
- Kirkland JB. Lipid peroxidation, protein thiol oxidation and DNA damage in hydrogen peroxide-induced injury to endothelial cells: role of activation of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochim Biophys Acta* 1991 May 17;1092(3):319-25.
- Kivatinitz SC, Pelsman MA, Alonso AC, Bagatolli L, Quiroga S. High-density lipoprotein aggregated by oxidation induces degeneration of neuronal cells. *J Neurochem* 1997 Nov;69(5):2102-14.
- Kohen R, Shadmi V, Kakunda A, Rubinstein A. Prevention of oxidative damage in the rat jejunal mucosa by pectin. *Br J Nutr* 1993 May;69(3):789-800.
- Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydin M, Karaman A, Gultek A, Akyol O, Gursoy MH, Aydin E. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg* 1999 Oct;34(10):1458-62.
- Koya D, Haneda M, Kikkawa R, King GL. d-alpha-tocopherol treatment prevents glomerular dysfunctions in diabetic rats through inhibition of protein kinase C-diacylglycerol pathway. *Biofactors* 1998;7(1-2):69-76.
- Koya D, Lee IK, Ishii H, Kanoh H, King GL. Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-alpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol* 1997 Mar;8(3):426-35.
- Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992 Jun;200(2):248-54.
- Kripke SA, Fox AD, Berman JM, Settle RG, Rombeau JL. Stimulation of intestinal mucosal growth with intracolonic infusion of short-chain fatty acids. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1989 Mar-Apr;13(2):109-16.
- Kubo K, Saito M, Tadokoro T, Maekawa A. Changes in susceptibility of tissues to lipid peroxidation after ingestion of various levels of docosahexaenoic acid and vitamin E. *Br J Nutr* 1997 Oct;78(4):655-69.
- Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, Nawata H, King GL. Normalization of diacylglycerol-protein kinase C activation by vitamin E in aorta of diabetic rats and

cultured rat smooth muscle cells exposed to elevated glucose levels. *Diabetes* 1994 Nov;43(11):1372-7.

- Kuratko CN. Iron increases manganese superoxide dismutase activity in intestinal epithelial cells. *Toxicol Lett* 1999 Jan 11;104(1-2):151-8.
- Kuroki F, Iida M, Matsumoto T, Aoyagi K, Kanamoto K, Fujishima M. Serum n3 polyunsaturated fatty acids are depleted in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1997 Jun;42(6):1137-41.
- Lange Y. Cholesterol movement from plasma membrane to rough endoplasmic reticulum. Inhibition by progesterone. *J Biol Chem* 1994 Feb 4;269(5):3411-4.
- Lash LH, Hagen TM, Jones DP. Exogenous glutathione protects intestinal epithelial cells from oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4641-5.
- Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Houlst JR. Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol* 1989 Sep 1;38(17):2859-65.
- Lechene de la Porte P, Abouakil N, Lafont H, Lombardo D. Subcellular localization of cholesterol ester hydrolase in the human intestine. *Biochim Biophys Acta* 1987 Aug 15;920(3):237-46.
- Lee DM, Dashti N, Mok T. Apolipoprotein B-100 is the major form of this apolipoprotein secreted by human intestinal Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 Oct 14;156(1):581-7.
- LeGrand TS, Aw TY. Chronic hypoxia alters glucose utilization during GSH-dependent detoxication in rat small intestine. *Am J Physiol* 1998 Feb;274(2 Pt 1):G376-84.
- LeGrand TS, Aw TY. Chronic hypoxia and glutathione-dependent detoxication in rat small intestine. *Am J Physiol* 1996 Apr;270(4 Pt 1):G725-9.
- LeGrand TS, Aw TY. Chronic hypoxia, glutathione-dependent detoxication, and metabolic instability in rat small intestine. *Am J Physiol* 1997 Feb;272(2 Pt 1):G328-34.

- 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 Oct;30(10):1483-90.
- Levin MS, Talkad VD, Gordon JI, Stenson WF. Trafficking of exogenous fatty acids within Caco-2 cells. *J Lipid Res* 1992 Jan;33(1):9-19.
- Levine RL, Oliver CN, Fulks RM, Stadtman ER. Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Apr;78(4):2120-4.
- 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 Gastrointest Liver Physiol* 1992;262:G319-G326.
- 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 Aug;30(8):1197-209.
- Levy E, Mehran M, Seidman E. Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* 1995 May;9(8):626-35.
- Levy E, Rizwan Y, Thibault L, Lepage G, Brunet S, Bouthillier L, Seidman E. Altered lipid profile, lipoprotein composition, and oxidant and antioxidant status in pediatric Crohn disease. *Am J Clin Nutr* 2000 Mar;71(3):807-15.
- Li WH, Tanimura M, Luo CC, Datta S, Chan L. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res* 1988 Mar;29(3):245-71.
- Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE, Mullin GE. Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996 Oct;41(10):2078-86.
- Linscheer WG, Vergroesen AJ. *Lipids. Modern Nutrition in Health and Disease*. 8th edition. 1994;1:47-85.
- Livrea MA, Tesoriere L, Pintaudi AM, Calabrese A, Maggio A, Freisleben HJ, D'Arpa D, D'Anna R, Bongiorno A. Oxidative stress and antioxidant status in beta-

- thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood* 1996 Nov 1;88(9):3608-14.
- Lombardo D, Fauvel J, Guy O. Studies on the substrate specificity of a carboxyl ester hydrolase from human pancreatic juice. I. Action on carboxyl esters, glycerides and phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 1980a Jan 11;611(1):136-46.
 - Lombardo D, Guy O, Figarella C. Purification and characterization of a carboxyl ester hydrolase from human pancreatic juice. *Biochim Biophys Acta* 1978 Nov 10;527(1):142-9.
 - Lombardo D, Guy O. Studies on the substrate specificity of a carboxyl ester hydrolase from human pancreatic juice. II. Action on cholesterol esters and lipid-soluble vitamin esters. *Biochim Biophys Acta* 1980b Jan 11;611(1):147-55.
 - Longo WE, Damore LJ, Mazuski JE, Smith GS, Panesar N, Kaminski DL. The role of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide and interleukin-1 stimulated enterocyte prostanoid formation. *Mediators Inflamm* 1998a;7(2):85-91.
 - Longo WE, Erickson B, Panesar N, Mazuski JE, Robinson S, Kaminski DL. The role of selective cyclooxygenase isoforms in human intestinal smooth muscle cell stimulated prostanoid formation and proliferation. *Mediators Inflamm* 1998b;7(6):373-80.
 - Lotscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E, Richter C. Hydroperoxides can modulate the redox state of pyridine nucleotides and the calcium balance in rat liver mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 Sep;76(9):4340-4
 - Lowe JB, Sacchettini JC, Laposata M, McQuillan JJ, Gordon JI. Expression of rat intestinal fatty acid-binding protein in *Escherichia coli*. Purification and comparison of ligand binding characteristics with that of *Escherichia coli*-derived rat liver fatty acid-binding protein. *J Biol Chem* 1987 Apr 25;262(12):5931-7.
 - Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993 Apr 29;362(6423):847-9.
 - Lowenstein CJ, Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 1992 Sep 4;70(5):705-7.

- MacDermott RP. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J Clin Immunol* 1999 Sep;19(5):266-72.
- Madesh M, Balasubramanian KA. Nitric oxide inhibits enterocyte mitochondrial phospholipase D. *FEBS Lett* 1997a Aug 18;413(2):269-72.
- Madesh M, Ibrahim SA, Balasubramanian KA. Phospholipase D activity in the intestinal mitochondria: activation by oxygen free radicals. *Free Radic Biol Med* 1997b;23(2):271-7.
- Magun AM, Brasitus TA, Glickman RM. Isolation of high density lipoproteins from rat intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 1985 Jan;75(1):209-18.
- Magun AM, Mish B, Glickman RM. Intracellular apoA-I and apoB distribution in rat intestine is altered by lipid feeding. *J Lipid Res* 1988 Sep;29(9):1107-16.
- Mahida YR, Wu KC, Jewell DP. Respiratory burst activity of intestinal macrophages in normal and inflammatory bowel disease. *Gut* 1989 Oct;30(10):1362-70.
- Malorni W, Rivabene R, Santini MT, Donelli G. N-acetylcysteine inhibits apoptosis and decreases viral particles in HIV-chronically infected U937 cells. *FEBS Lett* 1993 Jul 19;327(1):75-8.
- Manna C, Galletti P, Cucciolla V, Moltedo O, Leone A, Zappia V. The protective effect of the olive oil polyphenol (3,4-dihydroxyphenyl)-ethanol counteracts reactive oxygen metabolite-induced cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Nutr* 1997 Feb;127(2):286-92.
- Mansbach CM 2nd. The origin of chylomicron phosphatidylcholine in the rat. *J Clin Invest* 1977 Aug;60(2):411-20.
- Mariadason JM; Barkla DH; Gibson PR. Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. *Am J Physiol*, 272(4 Pt 1):G705-12 1997 Apr.
- Marks F, Furstenberger G. Cancer chemoprevention through interruption of multistage carcinogenesis. The lessons learnt by comparing mouse skin carcinogenesis and human large bowel cancer. *Eur J Cancer* 2000 Feb;36(3):314-29.
- Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA. Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem* 1999 Aug 13;274(33):22903-6.

- Martinez J, Sanchez T, Moreno JJ. Regulation of prostaglandin E2 production by the superoxide radical and nitric oxide in mouse peritoneal macrophages. *Free Radic Res* 2000 Apr;32(4):303-11.
- Masuda Y, Murano T. Effect of linoleic acid hydroperoxide on liver microsomal enzymes in vitro. *Jpn J Pharmacol* 1979 Apr;29(2):179-86.
- Mathur SN, Born E, Bishop WP, Field FJ. Effect of okadaic acid on apo B and apo A-I secretion by CaCo-2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1993 Jun 12;1168(2):130-43.
- Mathur SN, Born E, Murthy S, Field FJ : Microsomal triglyceride transfer protein in CaCo-2 cells: characterization and regulation. *J Lipid Res* 1997 Jan;38(1):61-7.
- Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 1986 Nov 15;137(10):3295-8.
- Matthews N, Neale ML, Jackson SK, Stark JM. Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* 1987 Sep;62(1):153-5.
- May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 1998 Sep 4;273(36):23039-45.
- McKenzie SJ, Baker MS, Buffinton GD, Doe WF. Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 1996 Jul 1;98(1):136-41.
- McKenzie SM, Doe WF, Buffinton GD. 5-aminosalicylic acid prevents oxidant mediated damage of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in colon epithelial cells. *Gut* 1999 Feb;44(2):180-5.
- Mehran M, Seidman E, Marchand R, Gurbindo C, Levy E. Tumor necrosis factor- α inhibits lipid and lipoprotein transport by Caco-2 cells. *Am J Physiol* 1995 Dec;269 (6 Pt 1):G953-60.
- Mehta A, Singh S, Dhawan V, Ganguly NK. Intestinal mucosal lipid peroxidation and absorptive function in *Salmonella typhimurium* mediated intestinal infection. *Mol Cell Biochem* 1998 Jan;178(1-2):345-52.
- Menconi MJ, Unno N, Smith M, Aguirre DE, Fink MP. Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide

- radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim Biophys Acta* 1998 Sep 16;1425(1):189-203.
- Mercer DW, Smith GS, Cross JM, Russell DH, Chang L, Cacioppo J. Effects of lipopolysaccharide on intestinal injury; potential role of nitric oxide and lipid peroxidation. *J Surg Res* 1996 Jun;63(1):185-92.
 - Middleton SJ, Shorthouse M, Hunter JO. Increased nitric oxide synthesis in ulcerative colitis. *Lancet* 1993 Feb 20;341(8843):465-6.
 - Miller DM; Aust SD. Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 271(1):113-9 1989 May 15.
 - Minotti G, Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 262(3):1098-104 1987 Jan 25.
 - Mitsuyama K, Saiki T, Kanauchi O, Iwanaga T, Tomiyasu N, Nishiyama T, Tateishi H, Shirachi A, Ide M, Suzuki A, Noguchi K, Ikeda H, Toyonaga A, Sata M. Treatment of ulcerative colitis with germinated barley foodstuff feeding: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 1998 Dec;12(12):1225-30.
 - Mizoguchi T, Morita Y, Nanjo H, Terada T, Nishihara T. Responses of glutathione-related enzymes in isolated rat small intestine to Fe(2+)-EDTA-mediated oxidative stress. *Biol Pharm Bull* 1994 May;17(5):607-11.
 - Moberly JB, Cole TG, Alpers DH, Schonfeld G. Oleic acid stimulation of apolipoprotein B secretion from HepG2 and Caco-2 cells occurs post-transcriptionally. *Biochim Biophys Acta* 1990 Jan 16;1042(1):70-80.
 - Mohrmann I, Mohrmann M, Biber J, Murer H. Sodium-dependent transport of Pi by an established intestinal epithelial cell line (CaCo-2). *Am J Physiol* 1986 Mar;250(3 Pt 1):G323-30.
 - Moore GA, Jewell SA, Bellomo G, Orrenius S. On the relationship between Ca²⁺ efflux and membrane damage during t-butylhydroperoxide metabolism by liver mitochondria. *FEBS Lett* 1983 Mar 21;153(2):289-92.

- Moore JW, Babidge WJ, Millard SH, Roediger WE. Thiolsmethyltransferase activity in the human colonic mucosa: implications for ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997a Oct;12(9-10):678-84.
- Moore JW, Millard S, Babidge W, Rowland R, Roediger WE. Hydrogen sulphide produces diminished fatty acid oxidation in the rat colon in vivo: implications for ulcerative colitis. *Aust N Z J Surg* 1997b May;67(5):245-9.
- Moreau H, Laugier R, Gargouri Y, Ferrato F, Verger R. Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology* 1988 Nov;95(5):1221-6.
- Morliere P, Moysan A, Gaboriau F, Santus R, Maziere JC, Dubertret L. Ultraviolet A radiation and the skin. Implications of activated forms of oxygen. *Current trends and newest results. Pathol Biol (Paris)* 1992 Feb;40(2):160-8.
- Murthy S, Born E, Mathur S, Field FJ. 13-hydroxy octadecadienoic acid (13-HODE) inhibits triacylglycerol-rich lipoprotein secretion by CaCo-2 cells. *J Lipid Res* 1998 Jun;39(6):1254-62.
- Murthy SN, Cooney CG, Clearfield HR. Hydrogen peroxide-induced alterations in prostaglandin secretion in the rat colon in vitro. *Inflammation* 1990 Dec;14(6):645-61.
- Mutlu-Turkoglu U, Erbil Y, Oztezcan S, Olgac V, Toker G, Uysal M. The effect of selenium and/or vitamin E treatments on radiation-induced intestinal injury in rats. *Life Sci* 2000 Apr 7;66(20):1905-13.
- Nakamura K, Stadtman ER. Oxidative inactivation of glutamine synthetase subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984 Apr;81(7):2011-5
- Nalini S, Balasubramanian KA. Effect of luminal exposure of oxidants on intestinal mucosal lipid peroxidation and absorptive function. *Scand J Gastroenterol* 1993 Mar;28(3):281-4.
- Neely MD, Sidell KR, Graham DG, Montine TJ. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits neurite outgrowth, disrupts neuronal microtubules, and modifies cellular tubulin. *J Neurochem* 1999 Jun;72(6):2323-33.
- Neiderhiser DH, Roth HP. Effect of phospholipase A on cholesterol solubilization by lecithin in a bile salt solution. *Gastroenterology* 1970 Jan;58(1):26-31.

- Nemani R, Lee EY. Reactivity of sulfhydryl groups of the catalytic subunits of rabbit skeletal muscle protein phosphatases 1 and 2A. *Arch Biochem Biophys* 1993 Jan;300(1):24-9.
- Neuzil J, Thomas SR, Stocker R. Requirement for, promotion, or inhibition by alpha-tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1997;22(1-2):57-71.
- Nicklin PL, Irwin WJ, Hassan IF, Mackay M. Proline uptake by monolayers of human intestinal absorptive (Caco-2) cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1992 Mar 2;1104(2):283-92.
- Nieto N, Fernandez MI, Torres MI, Rios A, Suarez MD, Gil A. Dietary monounsaturated n-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids affect cellular antioxidant defense system in rats with experimental ulcerative colitis induced by trinitrobenzene sulfonic acid. *Dig Dis Sci* 1998 Dec;43(12):2676-87.
- Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Matsuo S, Aw TY. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Am J Physiol* 1998 Feb;274(2 Pt 1):G270-6.
- Nosal'ova V, Bauer V. Protective effect of stobadine in experimental colitis. *Life Sci* 1999;65(18-19):1919-21.
- Nyman M, Asp NG. Fermentation of dietary fibre components in the rat intestinal tract. *Br J Nutr* 1982 May;47(3):357-66.
- Ockner RK, Hughes FB, Isselbacher KJ. Very low density lipoproteins in intestinal lymph: origin, composition, and role in lipid transport in the fasting state. *J Clin Invest* 1969 Nov;48(11):2079-88.
- Ockner RK, Manning JA, Kane JP. Fatty acid binding protein. Isolation from rat liver, characterization, and immunochemical quantification. *J Biol Chem* 1982 Jul 10;257(13):7872-8.
- Ockner RK, Manning JA. Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J Clin Invest* 1974 Aug;54(2):326-38.
- O'Doherty PJ, Kakis G, Kuksis A. Role of luminal lecithin in intestinal fat absorption. *Lipids* 1973 May;8(5):249-55.

- Ogasawara T, Ohnhaus EE, Hoensch HP. Glutathione and its related enzymes in the small intestinal mucosa of rats: effects of starvation and diet. *Res Exp Med (Berl)* 1989;189(3):195-204.
- Ogino T, Okada S. Oxidative damage of bovine serum albumin and other enzyme proteins by iron-chelate complexes. *Biochim Biophys Acta* 1995 Dec 14;1245(3):359-65.
- Olaya J, Neopikhanov V, Uribe A. Lipopolysaccharide of *Escherichia coli*, polyamines, and acetic acid stimulate cell proliferation in intestinal epithelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1999 Jan;35(1):43-8.
- Oliver CN, Ahn BW, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 1987 Apr 25;262(12):5488-91.
- Olivero A, Miglietta A, Gadoni E, Gabriel L. 4-Hydroxynonenal interacts with tubulin by reacting with its functional -SH groups. *Cell Biochem Funct* 1990 Apr;8(2):99-105.
- Otaka M, Singhal A, Hakomori S. Antibody-mediated targeting of differentiation inducers to tumor cells: inhibition of colonic cancer cell growth in vitro and in vivo. A preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 Jan 16;158(1):202-8.
- Pacifici RE, Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free-radical theory of aging revisited. *Gerontology* 1991;37(1-3):166-80.
- Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM. Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982 Jan;82(1):9-15.
- Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;548:87-99.
- Parks DA. Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 1989 Mar;30(3):293-8.
- Parthasarathy S, Subbaiah PV, Ganguly J. The mechanism of intestinal absorption of phosphatidylcholine in rats. *Biochem J* 1974 Jun;140(3):503-8.
- Perez R, Stevenson F, Johnson J, Morgan M, Erickson K, Hubbard NE, Morand L, Rudich S, Katznelson S, German JB. Sodium butyrate upregulates Kupffer cell PGE2 production and modulates immune function. *J Surg Res* 1998 Jul 15;78(1):1-6.

- Pittman RC, Attie AD, Carew TE, Steinberg D. Tissue sites of catabolism of rat and human low density lipoproteins in rats. *Biochim Biophys Acta* 1982 Jan 15;710(1):7-14.
- Porres JM, Stahl CH, Cheng WH, Fu Y, Roneker KR, Pond WG, Lei XG. Dietary intrinsic phytate protects colon from lipid peroxidation in pigs with a moderately high dietary iron intake. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999 May;221(1):80-6.
- Poulsen HE, Prieme H, Loft S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. *Eur J Cancer Prev* 1998 Feb;7(1):9-16.
- Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 1987 Sep 11;50(6):831-40.
- Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evans CA. Potential Problems of Ascorbate and Iron Supplementation: Pro-Oxidant Effect in Vivo? *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Nov 2;277(3):535-540.
- Puppo A, Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem J* 1988a Jan 1;249(1):185-90.
- Puppo A, Halliwell B. Formation of hydroxyl radicals in biological systems. Does myoglobin stimulate hydroxyl radical formation from hydrogen peroxide? *Free Radic Res Commun* 1988b;4(6):415-22.
- Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ;84:2995-2998.
- Rao GA, Johnston JM. Purification and properties of triglyceride synthetase from the intestinal mucosa. *Biochim Biophys Acta* 1966 Dec 7;125(3):465-73.
- Rao RK, Baker RD, Baker SS, Gupta A, Holycross M. Oxidant-induced disruption of intestinal epithelial barrier function: role of protein tyrosine phosphorylation. *Am J Physiol* 1997 Oct;273(4 Pt 1):G812-23.

- Realini CA, Althaus FR. Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation). *J Biol Chem* 1992 Sep 15;267(26):18858-65.
- Rechkemmer G, Ronnau K, von Engelhardt W. Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comp Biochem Physiol A* 1988;90(4):563-8.
- Rehman A, Collis CS, Yang M, Kelly M, Diplock AT, Halliwell B, Rice-Evans C. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochem Biophys Res Commun* 1998 May 8;246(1):293-8.
- Reifen R, Matas Z, Zeidel L, Berkovitch Z, Bujanover Y. Iron supplementation may aggravate inflammatory status of colitis in a rat model. *Dig Dis Sci* 2000 Feb;45(2):394-7.
- Reimund JM, Allison AC, Muller CD, Dumont S, Kenney JS, Baumann R, Duclos B, Poindron P. Antioxidants inhibit the in vitro production of inflammatory cytokines in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 1998 Feb;28(2):145-50.
- Reisher SR, Hughes TE, Ordovas JM, Schaefer EJ, Feinstein SI. Increased expression of apolipoprotein genes accompanies differentiation in the intestinal cell line Caco-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Jun 15;90(12):5757-61.
- Ricciarelli R, Tasinato A, Clement S, Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A. alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem J* 1998 Aug 15;334 (Pt 1):243-9.
- Rimbach G, Markant A, Most E, Pallauf J. Liver and colon oxidant status in growing rats fed increasing levels of dietary iron. *J Trace Elem Med Biol* 1997 Jun;11(2):99-104.
- Rivabene R, Mancini E, De Vincenzi M. In vitro cytotoxic effect of wheat gliadin-derived peptides on the Caco-2 intestinal cell line is associated with intracellular oxidative imbalance: implications for coeliac disease. *Biochim Biophys Acta* 1999 Jan 6;1453(1):152-60.
- Rivera VM, Greenberg ME. Growth factor-induced gene expression: the ups and downs of c-fos regulation. *New Biol* 1990 Sep;2(9):751-8.

- Roediger WE, Moore J, Babidge W. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1997 Aug;42(8):1571-9.
- Ruiz-Gutierrez V, Perez-Espinosa A, Vazquez CM, Santa-Maria C. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br J Nutr* 1999 Sep;82(3):233-41.
- Sabesin SM, Frase S. Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *J Lipid Res* 1977 Jul;18(4):496-511.
- Saito M, Kubo K, Ikegami S. An assessment of docosahexaenoic acid (DHA) intake with special reference to lipid metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1996 Jun;42(3):195-207.
- Saito M, Nakatsugawa K. Increased susceptibility of liver to lipid peroxidation after ingestion of a high fish oil diet. *Int J Vitam Nutr Res* 1994;64(2):144-51.
- Sakata T, Yajima T. Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract. *Q J Exp Physiol* 1984 Jul;69(3):639-48.
- Sakata T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br J Nutr* 1987 Jul;58(1):95-103.
- Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *Br J Pharmacol* 1995 Mar;114(6):1171-8.
- Samanta A, Das DK, Jones R, George A, Prasad MR. Free radical scavenging by myocardial fatty acid binding protein. *Free Radic Res Commun* 1989;7(2):73-82.
- Sandstrom PA, Roberts B, Folks TM, Buttke TM. HIV gene expression enhances T cell susceptibility to hydrogen peroxide-induced apoptosis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993 Nov;9(11):1107-13.
- Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995 Sep 1;55(17):3785-9.
- Saran M, Bors W. Direct and indirect measurements of oxygen radicals. *Klin Wochenschr* 1991 Dec 15;69(21-23):957-64.

- Saran M, Michel C, Bors W. Reaction of NO with O₂⁻. implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radic Res Commun* 1990;10(4-5):221-6.
- Scheppach W, Muller JG, Boxberger F, Dusel G, Richter F, Bartram HP, Christl SU, Dempfle CE, Kasper H. Histological changes in the colonic mucosa following irrigation with short-chain fatty acids. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997 Feb;9(2):163-8.
- Scheppach W. Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. A placebo-controlled trial. German-Austrian SCFA Study Group. *Dig Dis Sci* 1996 Nov;41(11):2254-9.
- Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* 1992 May 1;175(5):1181-94.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991 Aug;10(8):2247-58.
- Schroder O, Hess S, Caspary WF, Stein J. Mediation of differentiating effects of butyrate on the intestinal cell line Caco-2 by transforming growth factor-beta 1. *Eur J Nutr* 1999 Feb;38(1):45-50.
- Schwartz LH, Urban T, Hercberg S. Antioxidant minerals and vitamins. Role in cancer prevention. *Presse Med* 1994 Dec 10;23(39):1826-30.
- Scott J, Navaratnam N, Bhattacharya S, Morrison JR. The apolipoprotein B messenger RNA editing enzyme. *Curr Opin Lipidol* 1994 Apr;5(2):87-93.
- Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* 1985;5:365-90.
- Shils ME, Olson JA, Shike M. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Eighth edition. 1994 ; 1 : 185-213.
- Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C, Droge W. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1998 Apr;42(4):485-92.

- Siegers CP, Bumann D, Trepkau HD, Schadwinkel B, Baretton G. Influence of dietary iron overload on cell proliferation and intestinal tumorigenesis in mice. *Cancer Lett* 1992 Aug 31;65(3):245-9.
- Sies H. Biochemistry of oxydative stress. *Angew Chem Int* 1986 (25) : 1058-1071.
- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991 Sep 30;91(3C):31S-38S.
- Simmonds NJ, Allen RE, Stevens TR, Van Someren RN, Blake DR, Rampton DS. Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1992 Jul;103(1):186-96.
- Simmonds NJ, Millar AD, Blake DR, Rampton DS. Antioxidant effects of aminosalicylates and potential new drugs for inflammatory bowel disease: assessment in cell-free systems and inflamed human colorectal biopsies. *Aliment Pharmacol Ther* 1999 Mar;13(3):363-72.
- Sims JL, Berger SJ, Berger NA. Poly(ADP-ribose) Polymerase inhibitors preserve nicotinamide adenine dinucleotide and adenosine 5'-triphosphate pools in DNA-damaged cells: mechanism of stimulation of unscheduled DNA synthesis. *Biochemistry* 1983 Oct 25;22(22):5188-94.
- Singer II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF. Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1998 Aug;115(2):297-306.
- Sisley AC, Desai TR, Hynes KL, Gewertz BL, Dudeja PK. Decrease in mucosal alkaline phosphatase: a potential marker of intestinal reperfusion injury. *J Lab Clin Med* 1999 Apr;133(4):335-41.
- Skuladottir GV, Shi-Hua D, Brodie AE, Reed DJ, Wander RC. Effects of dietary oils and methyl ethyl ketone peroxide on in vivo lipid peroxidation and antioxidants in rat heart and liver. *Lipids* 1994 May;29(5):351-7.
- Smith HC, Kuo SR, Backus JW, Harris SG, Sparks CE, Sparks JD. In vitro apolipoprotein B mRNA editing: identification of a 27S editing complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Feb 15;88(4):1489-93.

- Soyars KE, Fischer JG. Iron supplementation does not affect cell proliferation or aberrant crypt foci development in the colon of sprague-dawley rats. *J Nutr* 1998 Apr;128(4):764-70.
- Srigriridhar K, Nair KM. Protective effects of antioxidant enzymes and GSH in vivo on iron mediated lipid peroxidation in gastrointestinal tract of rat. *Indian J Biochem Biophys* 1997 Aug;34(4):402-5.
- Stadtman ER. Ascorbic acid and oxidative inactivation of proteins. *Am J Clin Nutr* 1991 Dec;54(6 Suppl):1125S-1128S.
- Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino residues in proteins by radiolysis and by metal-catalysed reactions. *Annu Rev Biochem* 1993;62:797-821.
- Staprans I, Rapp JH, Pan XM, Kim KY, Feingold KR. Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum. *Arterioscler Thromb* 1994 Dec;14(12):1900-5.
- Stein J, Schroder O, Bonk M, Oremek G, Lorenz M, Caspary WF. Induction of glutathione-S-transferase-pi by short-chain fatty acids in the intestinal cell line Caco-2. *Eur J Clin Invest* 1996 Jan;26(1):84-7.
- Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD. Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. *J Clin Invest* 1985 Mar;75(3):1068-76.
- Sturniolo GC, Mestriner C, Lecis PE, D'Odorico A, Venturi C, Irato P, Cecchetto A, Tropea A, Longo G, D'Inca R. Altered plasma and mucosal concentrations of trace elements and antioxidants in active ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1998 Jun;33(6):644-9.
- Sullivan SG, Chiu DT, Errasfa M, Wang JM, Qi JS, Stern A. Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells. *Free Radic Biol Med* 1994 Mar;16(3):399-403.
- Sun Z, Wang X, Deng X, Borjesson A, Wallen R, Hallberg E, Andersson R. Phagocytic and intestinal endothelial and epithelial barrier function during the early stage of small intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock* 2000 Mar;13(3):209-16.

- Suzuki YJ, Ford GD. Inhibition of Ca(2+)-ATPase of vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum by reactive oxygen intermediates. *Am J Physiol* 1991 Aug;261(2 Pt 2):H568-74.
- Suzuki YJ; Forman HJ; Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 22(1-2):269-85 1997.
- Sviridov D. Intracellular cholesterol trafficking. *Histol Histopathol* 1999 Jan;14(1):305-19.
- Sweetser DA, Birkenmeier EH, Klisak IJ, Zollman S, Sparkes RS, Mohandas T, Lusis AJ, Gordon JI. The human and rodent intestinal fatty acid binding protein genes. A comparative analysis of their structure, expression, and linkage relationships. *J Biol Chem* 1987 Nov 25;262(33):16060-71.
- Tadros T, Traber DL, Hegggers JP, Herndon DN. Angiotensin II inhibitor DuP753 attenuates burn- and endotoxin-induced gut ischemia, lipid peroxidation, mucosal permeability, and bacterial translocation. *Ann Surg* 2000 Apr;231(4):566-76.
- Tall AR, Green PH, Glickman RM, Riley JW. Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apoproteins in the rat. *J Clin Invest* 1979 Oct;64(4):977-89.
- Tardieu D, Jaeg JP, Cadet J, Embvani E, Corpet DE, Petit C. Dextran sulfate enhances the level of an oxidative DNA damage biomarker, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in rat colonic mucosa. *Cancer Lett* 1998 Dec 11;134(1):1-5.
- Thomas PD; Poznansky MJ. Lipid peroxidation inactivates rat liver microsomal glycerol-3-phosphate acyl transferase. Effect of iron and copper salts and carbon tetrachloride. *J Biol Chem*, 265(5):2684-91 1990 Feb 15.
- Thornalley PJ, Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* 1985 Jan 21;827(1):36-44.
- Traber MG, Kayden HJ, Rindler MJ. Polarized secretion of newly synthesized lipoproteins by the Caco-2 human intestinal cell line. *J Lipid Res* 1987 Nov;28(11):1350-63.
- Tran K, Proulx PR, Chan AC. Vitamin E suppresses diacylglycerol (DAG) level in thrombin-stimulated endothelial cells through an increase of DAG kinase activity. *Biochim Biophys Acta* 1994 May 13;1212(2):193-202.

- Tran K, Wong JT, Lee E, Chan AC, Choy PC. Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A2 activity in rat heart myoblastic cells. *Biochem J* 1996 Oct 15;319 (Pt 2):385-91.
- Trotter PJ, Storch J. Fatty acid esterification during differentiation of the human intestinal cell line Caco-2. *J Biol Chem* 1993 May 15;268(14):10017-23.
- Tsao D, Morita A, Bella A Jr, Luu P, Kim YS. Differential effects of sodium butyrate, dimethyl sulfoxide, and retinoic acid on membrane-associated antigen, enzymes, and glycoproteins of human rectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 1982 Mar;42(3):1052-8.
- Tytgat GN, Rubin CE, Saunders DR. Synthesis and transport of lipoprotein particles by intestinal absorptive cells in man. *J Clin Invest* 1971 Oct;50(10):2065-78.
- Urayama S, Musch MW, Retsky J, Madonna MB, Straus D, Chang EB. Dexamethasone protection of rat intestinal epithelial cells against oxidant injury is mediated by induction of heat shock protein 72. *J Clin Invest* 1998 Nov 15;102(10):1860-5.
- Utesch D, Traiser M, Gath I, Dorresteiin AW, Maier P, Oesch F. Effects of sodium butyrate on DNA content, glutathione S-transferase activities, cell morphology and growth characteristics of rat liver nonparenchymal epithelial cells in vitro. *Carcinogenesis* 1993 Mar;14(3):457-62.
- van den Berg JJ, Op den Kamp JA, Lubin BH, Kuypers FA. Conformational changes in oxidized phospholipids and their preferential hydrolysis by phospholipase A2: a monolayer study. *Biochemistry* 1993 May 11;32(18):4962-7.
- van der Vliet A, Bast A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases. *Free Radic Biol Med* 1992;12(6):499-513.
- van der Vliet A, Tuinstra TJ, Bast A. Modulation of oxidative stress in the gastrointestinal tract and effect on rat intestinal motility. *Biochem Pharmacol* 1989 Sep 1;38(17):2807-18.
- Van Greevenbroek MM; de Bruin TW . Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*, 141 Suppl 1():S9-16 1998 Dec .

- van Lieshout EM, Ekkel MP, Bedaf MM, Nijhoff WA, Peters WH. Effects of dietary anticarcinogens on rat gastrointestinal glutathione peroxidase activity. *Oncol Rep* 1998 Jul-Aug;5(4):959-63.
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97-120.
- VanWinkle WB, Snuggs M, Miller JC, Buja LM. Cytoskeletal alterations in cultured cardiomyocytes following exposure to the lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal. *Cell Motil Cytoskeleton* 1994;28(2):119-34.
- Vecchini F, Pringault E, Billiar TR, Geller DA, Hausel P, Felley-Bosco E. Decreased activity of inducible nitric oxide synthase type 2 and modulation of the expression of glutathione S-transferase alpha, bcl-2, and metallothioneins during the differentiation of CaCo-2 cells. *Cell Growth Differ* 1997 Feb;8(2):261-8.
- Velazquez OC, Jabbar A, DeMatteo RP, Rombeau JL. Butyrate inhibits seeding and growth of colorectal metastases to the liver in mice. *Surgery* 1996a Aug;120(2):440-7; discussion 447-8.
- Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Implications for neoplasia. *Dig Dis Sci* 1996b Apr;41(4):727-39.
- Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* 1997;427:123-34.
- Vernia P, Marcheggiano A, Caprilli R, Frieri G, Corrao G, Valpiani D, Di Paolo MC, Paoluzi P, Torsoli A. Short-chain fatty acid topical treatment in distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1995 Jun;9(3):309-13.
- Virgili F, Canali R, Figus E, Vignolini F, Nobili F, Mengheri E. Intestinal damage induced by zinc deficiency is associated with enhanced CuZn superoxide dismutase activity in rats: effect of dexamethasone or thyroxine treatment. *Free Radic Biol Med* 1999 May;26(9-10):1194-201.
- Virgili F, Canali R, Figus E, Vignolini F, Nobili F, Mengheri E. Intestinal damage induced by zinc deficiency is associated with enhanced CuZn superoxide dismutase activity in rats: effect of dexamethasone or thyroxine treatment. *Free Radic Biol Med* 1999 May;26(9-10):1194-201.

- von Engelhardt W, Bartels J, Kirschberger S, Meyer zu Duttingdorf HD, Busche R. Role of short-chain fatty acids in the hind gut. *Vet Q* 1998;20 Suppl 3:S52-9.
- Wagner RD, Krul ES, Moberly JB, Alpers DH, Schonfeld G. Apolipoprotein expression and cellular differentiation in Caco-2 intestinal cells. *Am J Physiol* 1992 Aug;263(2 Pt 1):E374-82.
- Weiser H, Riss G, Kormann AW. Biodiscrimination of the eight alpha-tocopherol stereoisomers results in preferential accumulation of the four 2R forms in tissues and plasma of rats. *J Nutr* 1996 Oct;126(10):2539-49.
- Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;548:9-37.
- Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis* 1990 Jul;162(1):82-90.
- Wells CL, Jechorek RP, Olmsted SB, Erlandsen SL. Effect of LPS on epithelial integrity and bacterial uptake in the polarized human enterocyte-like cell line Caco-2. *Circ Shock* 1993 Aug;40(4):276-88.
- Westergaard H, Dietschy JM. Delineation of the dimensions and permeability characteristics of the two major diffusion barriers to passive mucosal uptake in the rabbit intestine. *J Clin Invest* 1974 Sep;54(3):718-32.
- Westergaard H, Dietschy JM. The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. *J Clin Invest* 1976 Jul;58(1):97-108.
- Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, Eisenberg C, Munck A, Hermier M, Schmitz J, Gay G, Rader DJ, Gregg RE. Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science* 1992 Nov 6;258(5084):999-1001.
- Whitehead RH, Young GP, Bhathal PS. Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). *Gut* 1986 Dec;27(12):1457-63.
- Wiercinska-Drapalo A, Flisiak R, Prokopowicz D. Mucosal and plasma prostaglandin E2 in ulcerative colitis. *Hepatogastroenterology* 1999 Jul-Aug;46(28):2338-42.

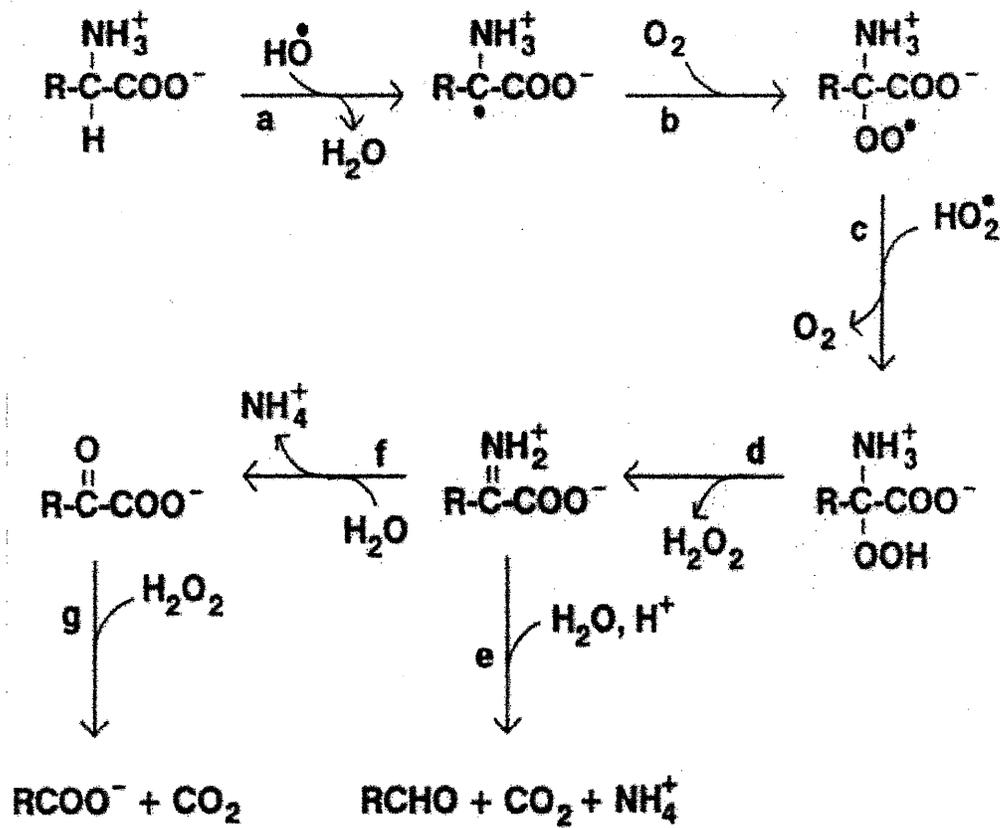
- Williams GM, Iatropoulos MJ, Whysner J. Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food Chem Toxicol* 1999;37:1027-1038.
- Williams JG, Hughes LE, Hallett MB. Toxic oxygen metabolite production by circulating phagocytic cells in inflammatory bowel disease. *Gut* 1990 Feb;31(2):187-93.
- Wilson AJ, Gibson PR. Short-chain fatty acids promote the migration of colonic epithelial cells in vitro. *Gastroenterology* 1997 Aug;113(2):487-96.
- Windmueller HG, Levy RI. Production of beta-lipoprotein by intestine in the rat. *J Biol Chem* 1968 Sep 25;243(18):4878-84.
- Wolin MJ. Fermentation in the rumen and human large intestine. *Science* 1981 Sep 25;213(4515):1463-8.
- Wright MO, Burden V, Lee J, Eitenmiller RR, Fischer JG. High dietary iron enhances oxidative stress in liver but does not increase aberrant crypt foci development in rats with low vitamin E status. *Nutr Cancer* 1999;35(2):143-52.
- Yamada T, Grisham MB. Role of neutrophil-derived oxidants in the pathogenesis of intestinal inflammation. *Klin Wochenschr* 1991 Dec 15;69(21-23):988-94.
- Yamada T. *Textbook of gastroenterology*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia. 1991;volume one : 353-381.
- Yamauchi N, Kuriyama H, Watanabe N, Neda H, Maeda M, Niitsu Y. Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. *Cancer Res* 1989 Apr 1;49(7):1671-5.
- Yavuz Y, Yuksel M, Yegen BC, Alican I. The effect of antioxidant therapy on colonic inflammation in the rat. *Res Exp Med (Berl)* 1999 Oct;199(2):101-10.
- Yim MB, Chock PB, Stadtman ER. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Jul;87(13):5006-10.
- Young IS, Trouton TG, Torney JJ, McMaster D, Callender ME, Trimble ER. Antioxidant status and lipid peroxidation in hereditary haemochromatosis. *Free Radic Biol Med* 1994 Mar;16(3):393-7.

- Zick Y, Sagi-Eisenberg R. A combination of H₂O₂ and vanadate concomitantly stimulates protein tyrosine phosphorylation and polyphosphoinositide breakdown in different cell lines. *Biochemistry* 1990 Nov 6;29(44):10240-5.
- Zimmerman RJ, Chan A, Leadon SA. Oxidative damage in murine tumor cells treated in vitro by recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res* 1989a Apr 1;49(7):1644-8.
- Zimmerman RJ, Marafino BJ Jr, Chan A, Landre P, Winkelhake JL. The role of oxidant injury in tumor cell sensitivity to recombinant human tumor necrosis factor in vivo. Implications for mechanisms of action. *J Immunol* 1989b Feb 15;142(4):1405-9.
- Zingarelli B, Szabo C, Salzman AL. Blockade of Poly(ADP-ribose) synthetase inhibits neutrophil recruitment, oxidant generation, and mucosal injury in murine colitis. *Gastroenterology* 1999 Feb;116(2):335-45.

ANNEXES

ANNEXE 1

Voies d'oxydation des acides aminés (Stadtman 1993).



Annexe 1 : Voies d'oxydation des acides aminés (Stadtman 1993).

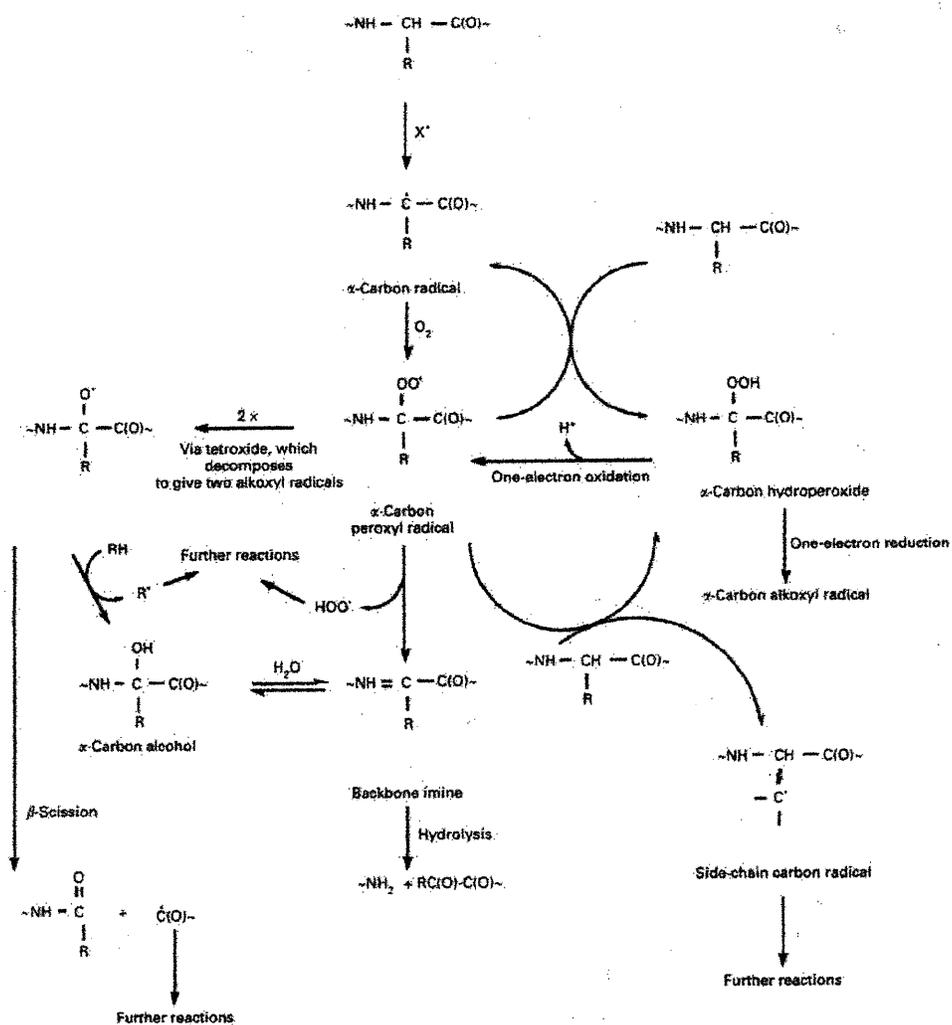
ANNEXE 2

Oxydation de la chaîne aliphatique des protéines en présence d'oxygène

(Dean *et al.* 1997).

ANNEXE 3

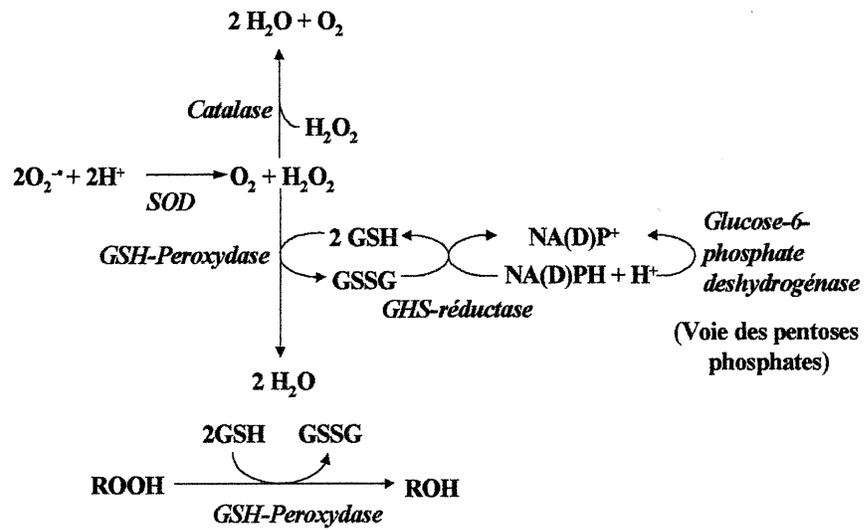
Oxydation du carbone α d'un acide aminé en présence d'oxygène et répercussions sur la protéine (Dean *et al.* 1997).



Annexe 3 : Oxydation du carbone α d'un acide aminé en présence d'oxygène et répercussions sur la protéine (Dean *et al.* 1997).

ANNEXE 4

Mécanismes des enzymes antioxydantes.



Annexe 4 : Mécanismes des enzymes antioxydantes.

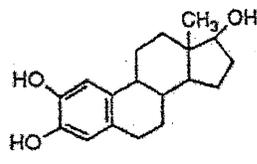
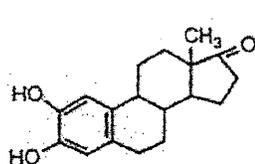
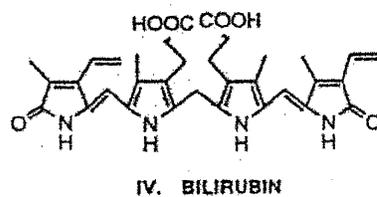
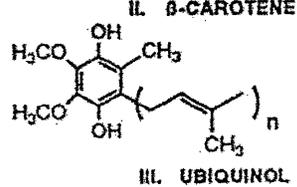
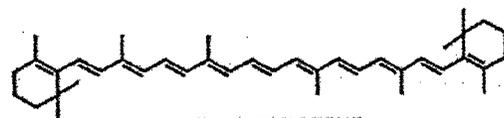
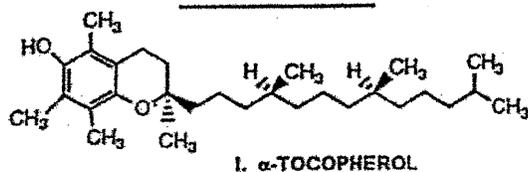
ANNEXE 5

Structure des antioxydants liposolubles et hydrosolubles les plus communs

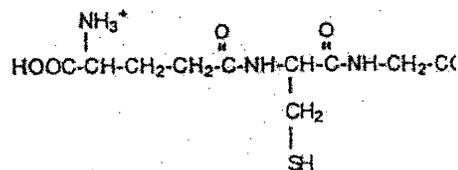
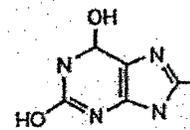
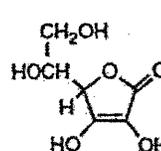
(Krinski 1992).

ANTIOXIDANT STRUCTURES

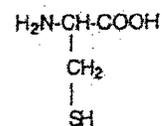
LIPID-SOLUBLE



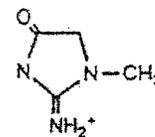
WATER-SOLUBLE



IX. GLUTATHIONE



X. CYSTEINE

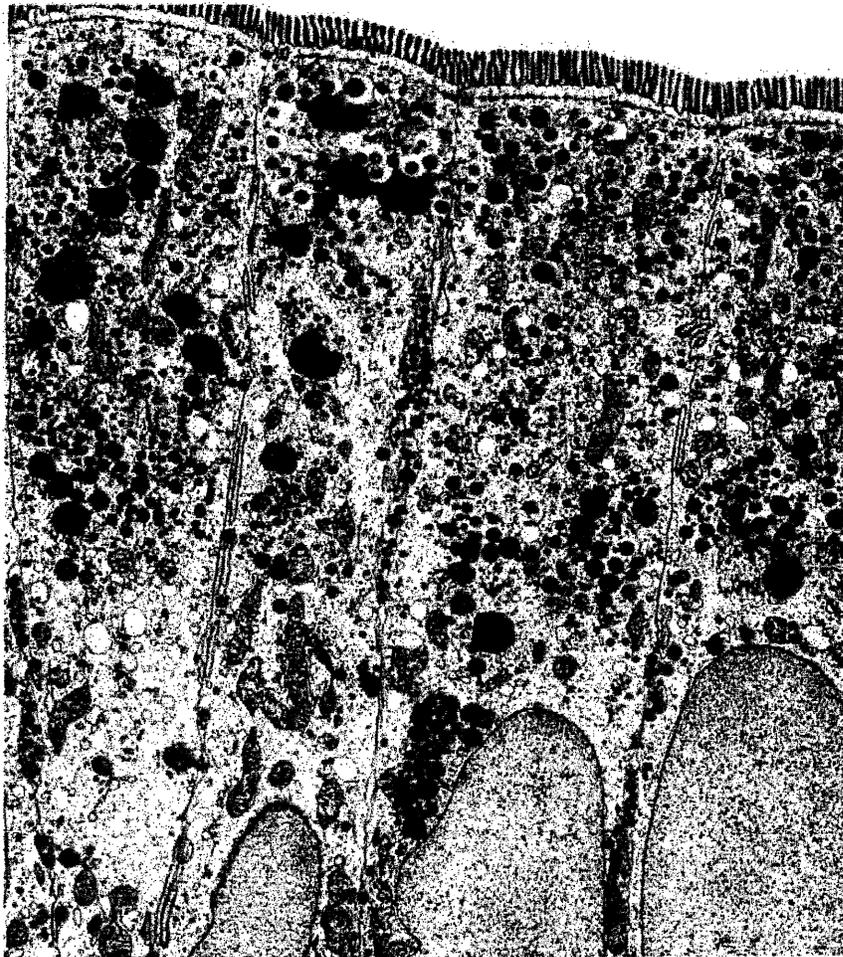


XI. CREATININE

Annexe 5 : Structure des antioxydants liposolubles et hydrosolubles les plus communs (Krinski 1992).

ANNEXE 6

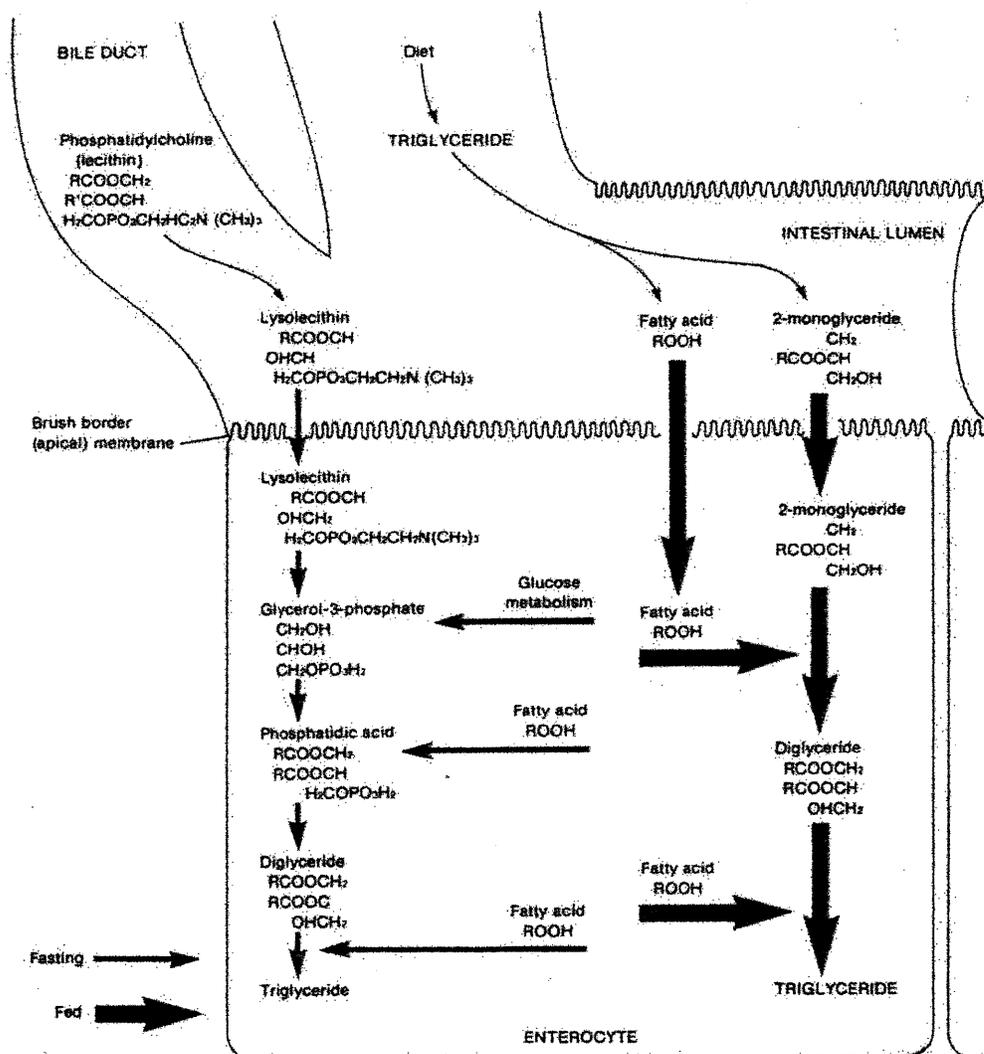
Cellule intestinale vue par microscopie électronique (x 8000) après un repas gras
(Yamada 1991).



Annexe 6 : Cellule intestinale vue par microscopie électronique (x 8000) après un repas gras (Yamada 1991).

ANNEXE 7

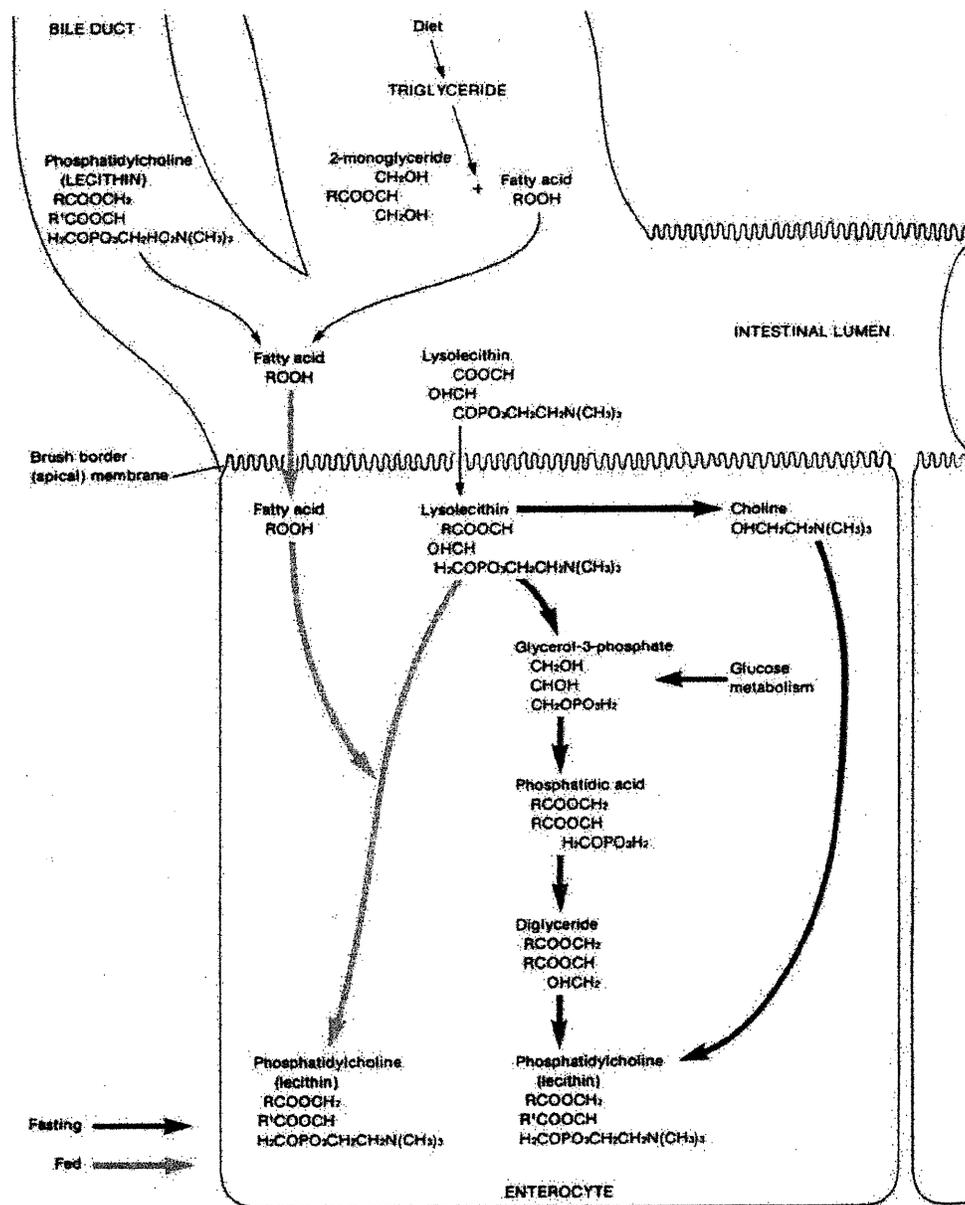
Biosynthèse des triglycérides par la voie du 2-monoacylglycerol (fed) ou du glycerol-3-phosphate (fasting) (Yamada 1991).



Annexe 7 : Biosynthèse des triglycérides par la voie du 2-monoacylglycerol (fed) ou du glycerol-3-phosphate (fasting) (Yamada 1991).

ANNEXE 8

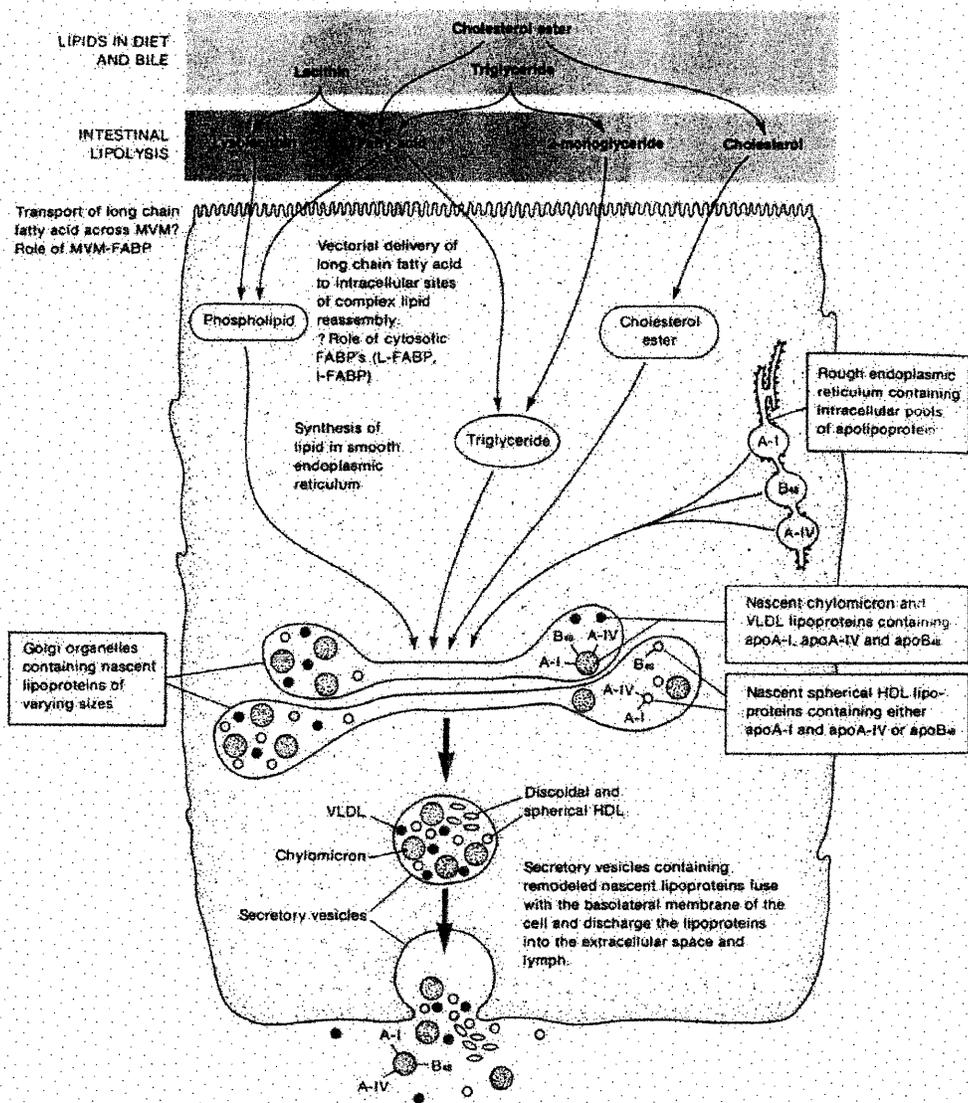
Biosynthèse des phospholipides par la voie de l'acide phosphatidique-phosphorylcholine (fasting) et la voie de réacylation des lysophospholipides absorbés (fed) (Yamada 1991).



Annexe 8 : Biosynthèse des phospholipides par la voie de l'acide phosphatidique-phosphorylcholine (fasting) et la voie de réacylation des lysophospholipides absorbés (fed) (Yamada 1991).

ANNEXE 9

Voies intracellulaires d'assemblage des lipoprotéines intestinales (Yamada 1991).



Annexe 9 : Voies intracellulaires d'assemblage des lipoprotéines intestinales (Yamada 1991).

ANNEXE 10

Différentes classes de lipoprotéines plasmatiques (Yamada 1991).

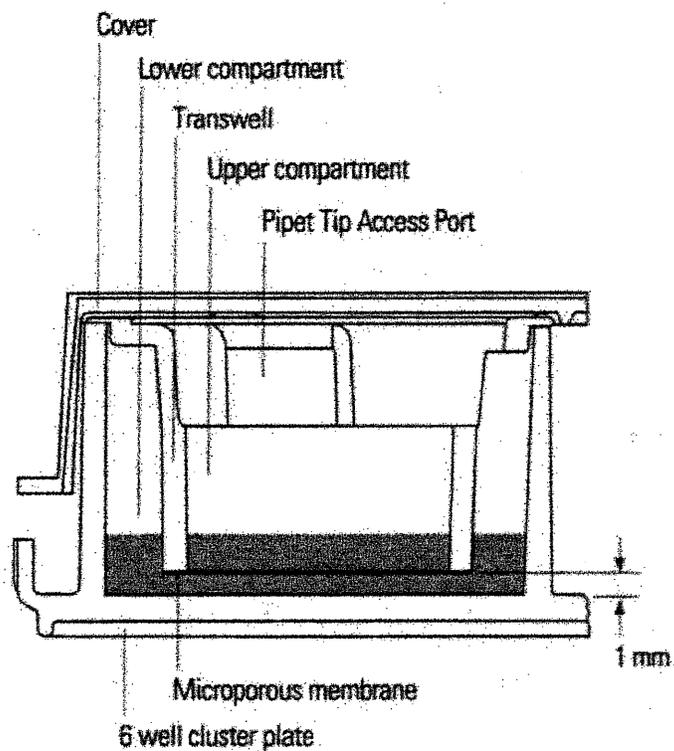
Human Plasma Lipoprotein Subclasses

SUBCLASS	SIZE	TISSUE ORIGIN	LIPID COMPOSITION	PROTEIN COMPOSITION	METABOLISM
Chylomicrons	>100 nM	Intestine	Triglyceride with smaller amounts of free cholesterol, cholesteryl ester, and phospholipid	Apo A-I, A-II, A-IV, B ₄₈ ; acquire apo E and C apoproteins following secretion into lymph	Major vehicle for transport of dietary triglyceride and fat-soluble vitamins. Converted to chylomicron remnant following lipolysis of core triglyceride by lipoprotein lipase, for which apo CII is an obligate cofactor. Liberated surface protein components arising as a result of lipolytic shrinkage (apo A-I, A-II, A-IV) fuse with phospholipid, forming high-density lipoproteins (HDL).
Chylomicron remnants	≈100 nM	See above	Triglyceride; relatively enriched in free cholesterol and cholesteryl ester compared with chylomicrons	Apo E, B ₄₈	Largely cleared by liver but uptake demonstrated to a smaller extent in a number of peripheral tissues, including bone marrow. Role of a distinct receptor is possible, but this requires confirmation.
Very low density lipoproteins (VLDL)	30-80 nM	Liver	Triglyceride with smaller amounts of free cholesterol, cholesteryl ester, and phospholipid	Apo B ₁₀₀ , E, Cs	Major vehicle for transport of endogenous triglyceride. They are converted to VLDL remnants and intermediate density lipoproteins (IDL) by lipolytic actions of lipoprotein and hepatic lipase. Some VLDL remnants are cleared by liver, but most are converted to IDL in circulation. Surface protein components are liberated as a result of lipolytic shrinkage and contribute to plasma HDL pool.
Intermediate density lipoproteins	30-60 nM	See above	Triglyceride/cholesteryl ester with smaller amounts of free cholesterol and phospholipid	Apo B ₁₀₀ , E	Small amounts are taken up by LDL receptor (apo B, E receptor). Most are converted to LDL via continued intravascular lipolysis of core triglyceride.
Low density lipoproteins (LDL)	≈20 nM	See above	Cholesteryl ester with smaller amounts of triglyceride, free cholesterol, phospholipid	Apo B ₁₀₀	Major transporter of plasma cholesterol. They are taken up by LDL (apo B, E) receptor, which is expressed on all cells.
High density lipoproteins	8-12 nM	Intestine Liver Plasma compartment	Phospholipid with smaller amounts of free cholesterol and cholesteryl ester and minor amounts of triglyceride	Apo A-I, A-II, A-IV, E	Synthesized directly by intestine and liver. They arise also as a result of intravascular catabolism of chylomicrons and VLDL. They participate in a variety of lipid exchange reactions and are probably involved in cholesterol mobilization from cells (so-called reverse cholesterol transport). Details of their catabolic fate, however, are unclear. No consensus on whether an HDL receptor exists.

Annexe 10 : Différentes classes de lipoprotéines plasmatiques (Yamada 1991).

ANNEXE 11

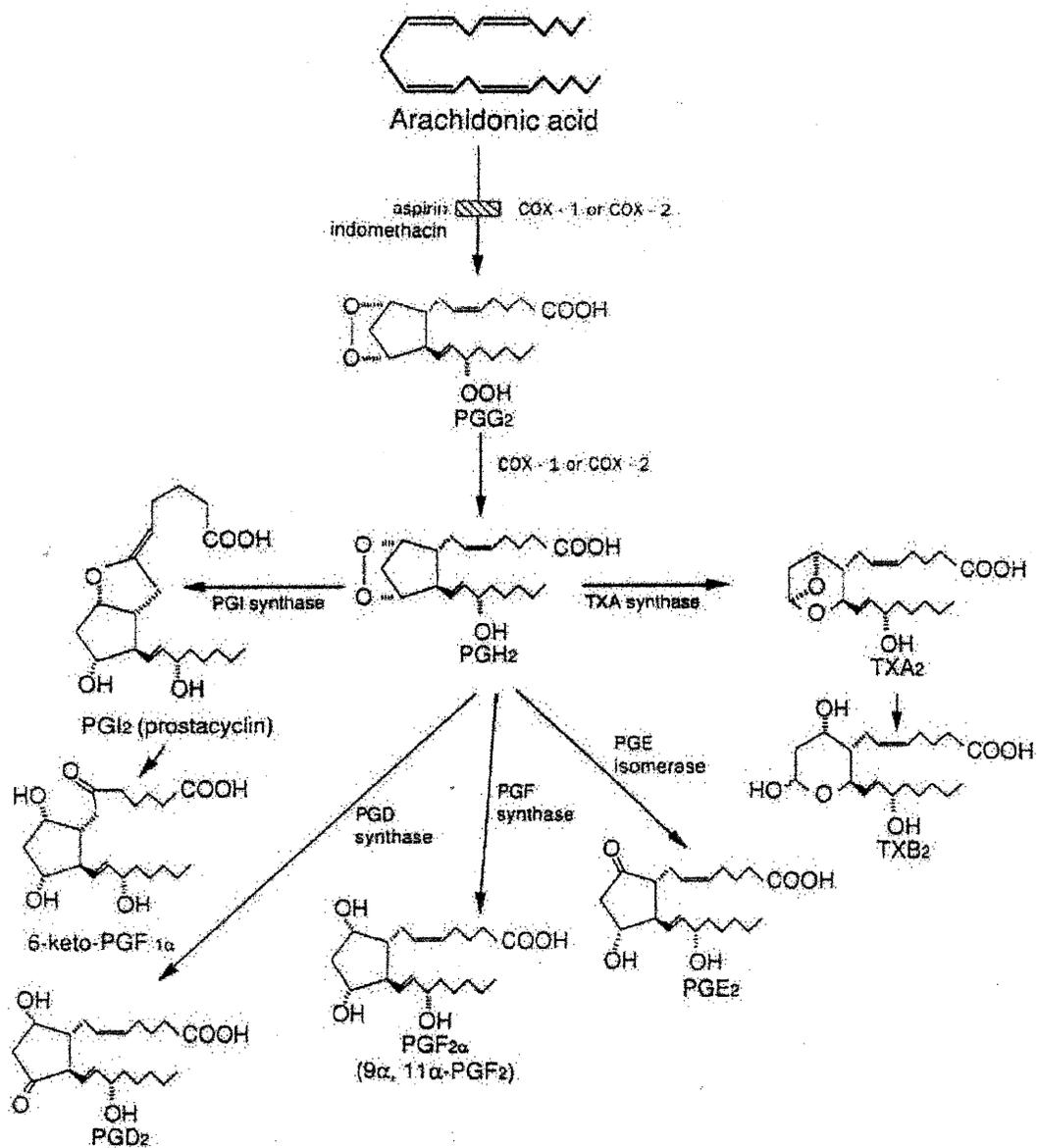
Schéma d'un puits avec membrane microporeuse (© Costar) servant lors de la mise en culture des cellules Caco-2.



Annexe 11 : Schéma d'un puits avec membrane microporeuse (© Costar) servant lors de la mise en culture des cellules Caco-2.

ANNEXE 12

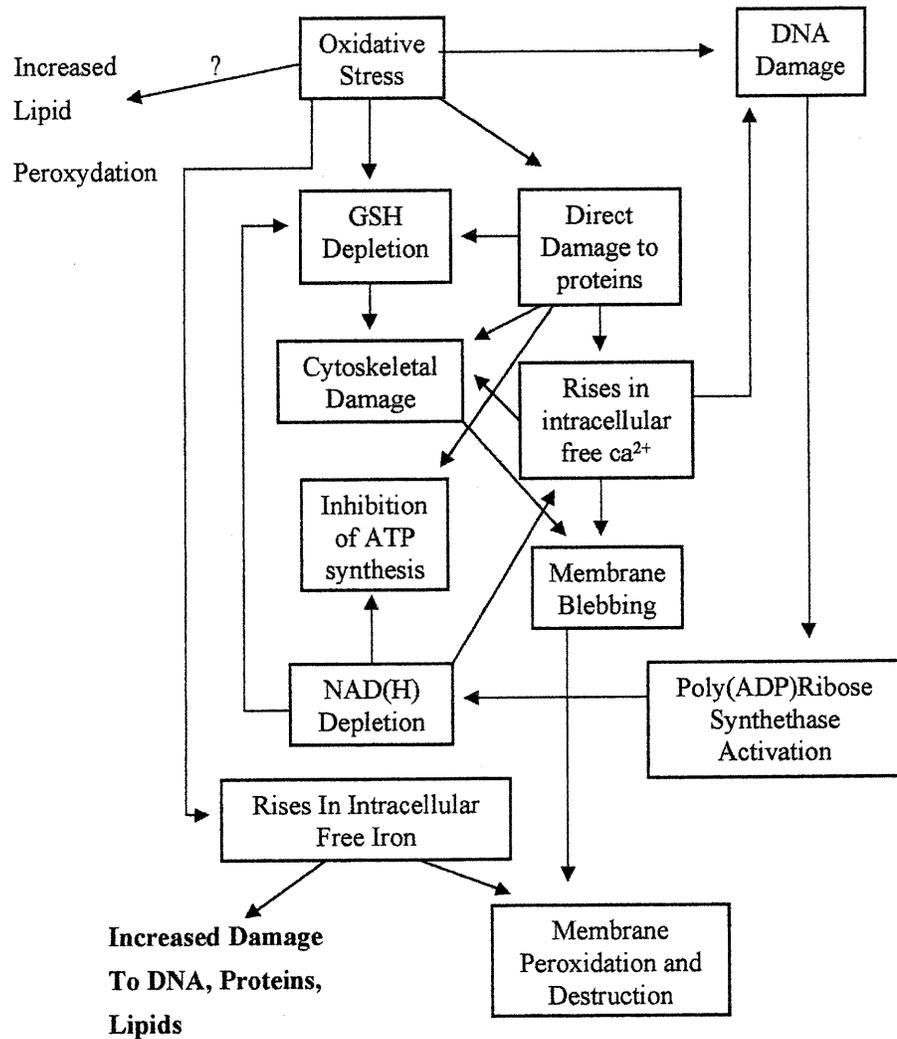
Cascade de la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique
(Vane *et al.* 1998).



Annexe 12 : Cascade de la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (Vane *et al.* 1998).

ANNEXE 13

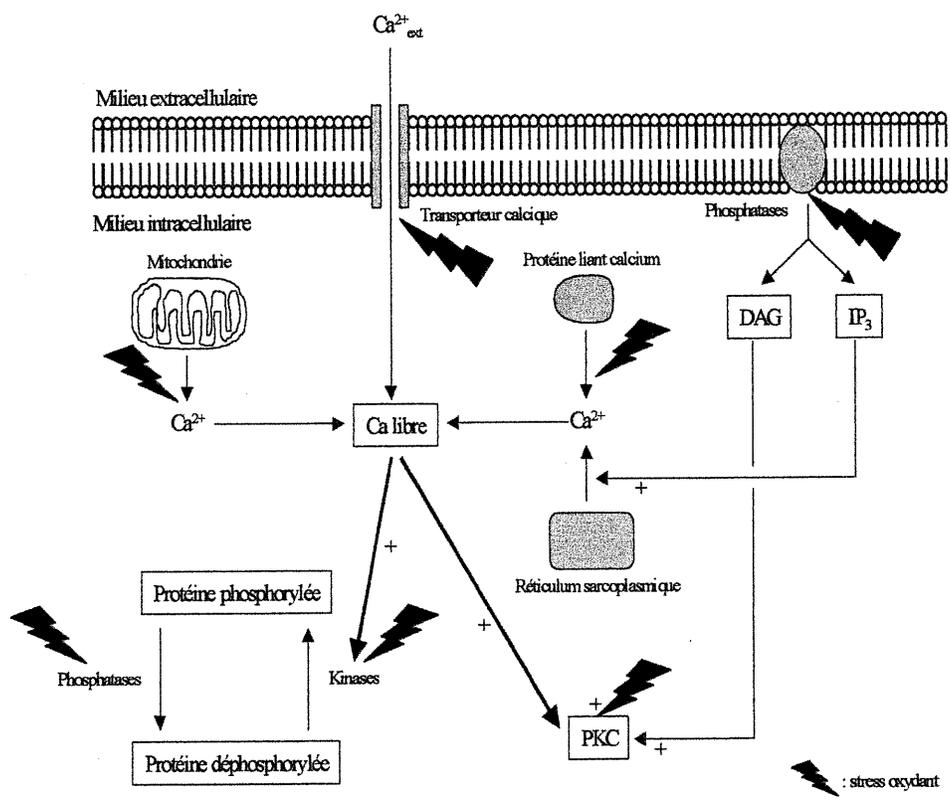
Interactions des mécanismes d'endommagement cellulaire par le stress oxydant
(Halliwell *et al.* 1992).



Annexe 13 : Interactions des mécanismes d'endommagement cellulaire par le stress oxydant (Halliwell *et al.* 1992).

ANNEXE 14

Effets du stress oxydant sur la libération de calcium et l'activité des phosphatases et kinases au niveau des cellules intestinales.



Annexe 14 : Effets du stress oxydant sur la libération de calcium et l'activité des phosphatases et kinases au niveau des cellules intestinales.

ANNEXE 15

Maladies inflammatoires de l'intestin (5.7 - pages 1 à 5) et Fibrose kystique (12.8 – pages 1 à 2) dans le Manuel de Nutrition Clinique – CPDQ 1991.

5.7 MALADIES INFLAMMATOIRES DE L'INTESTIN

Maladie de Crohn

Définition
Critères diagnostiques
Indice d'activité de la maladie
Approche nutritionnelle
Buts
Justification
Principes
Recommandations alimentaires
Problèmes particuliers
Considérations particulières

Colite ulcéreuse
Définition
Evolution clinique
Approche nutritionnelle
Problèmes particuliers

Références
Ressource

Maladie de Crohn^a

Définition

Inflammation chronique et récidivante, d'étiologie inconnue, pouvant atteindre n'importe quel segment digestif. Les régions les plus souvent atteintes sont l'iléon terminal, le côlon proximal et la région anorectale. Un ou plusieurs segments peuvent être touchés simultanément: les autres segments en apparence intacts sont parfois anormaux à l'histologie. La maladie peut porter atteinte à l'estomac et au duodénum, ce qui est rare mais peut être grave. La maladie de Crohn présente des complications locales (fistules, abcès, rétrécissements, etc.) et des manifestations systémiques extra-intestinales des plus variées^{1,6}.

Critères diagnostiques

Il n'existe pas de critères pathognomoniques: le diagnostic est un d'exclusion des autres désordres gastro-intestinaux chroniques et récidivants. Parmi les éléments essentiels à un diagnostic plus approprié, on retrouve: l'évolution clinique fluctuante, chronique et récidivante; le caractère segmentaire des lésions à la radiologie ou à l'endoscopie; l'atteinte inflammatoire transmurale touchant simultanément ou successivement la muqueuse, la musculuse, la séreuse, souvent le mésentère et les ganglions régionaux. La présence de granulomes non caséifiés et à cellules géantes à l'histologie signe généralement le diagnostic de la maladie de Crohn^{1,3}.

^a Désignée aussi sous les appellations suivantes: iléite régionale, iléite terminale, iléite granulomateuse, entérite régionale, entérite segmentaire, iléo-colite granulomateuse, colite segmentaire et colite granubmateuse¹.

Indice d'activité de la maladie

Un indice d'activité de la maladie composé de huit critères et fondé sur un système de pointage gravitant autour du chiffre 150 a été défini par le comité d'étude coopérative de la maladie de Crohn (tableau 5.7-1). D'autres indices peuvent aussi être utilisés⁶.

Approche nutritionnelle

Buts

- Promouvoir un état nutritionnel optimal, en apportant une attention particulière à la compétence immunitaire.
- Provoquer une rémission clinique aussi longue que possible.
- Prévenir ou retarder une intervention chirurgicale.

Justification

La maladie de Crohn entraîne des problèmes nutritionnels complexes qui varient selon le site et la gravité de l'atteinte inflammatoire¹⁻⁸. De façon générale, la malnutrition est engendrée par:

- une ingestion insuffisante à la suite d'anorexie, d'anomalie du goût, de fièvre ou de douleur abdominale;
- une réduction de l'absorption (lors d'une atteinte du grêle) due à:
 - la perte de l'intégrité fonctionnelle des villosités à la suite de leur aplatissement;
 - une infiltration inflammatoire des autres couches de la paroi;
 - une prolifération bactérienne;
 - une diminution de la surface d'absorption à cause de l'inflammation et dans les cas de résection ou de dérivation intestinale;
- une augmentation des pertes de nutriments au niveau de la paroi intestinale (pertes exsudatives et sanguines) et, dans plusieurs cas, à la suite de la formation de fistules;
- une combinaison de ces facteurs^{1,3,9,16}.

Un soutien nutritionnel adéquat est justifié, d'autant plus que l'utilisation chronique de médicaments visant à atténuer la réaction inflammatoire tissulaire, tels les glucocorticoïdes (ex.: prednisone) et les agents immunosuppresseurs (ex.: salazopyrine, azathioprine, 6-mercaptopurine, méthronidazole), contribue à troubler l'état nutritionnel (tableau 13.3-4). Enfin, le recours à des modes d'alimentation qui permettent d'épargner le tube digestif se traduit souvent par une rémission clinique, à tout le moins temporaire, de la maladie^{1,6,17-20}.

Principes

- Fournir un apport alimentaire qui répond aux besoins particuliers du patient (chap. 1.2).
- Minimiser les pertes entérales en tenant compte de la tolérance individuelle.
- Prévenir ou corriger un retard de croissance chez l'enfant et chez l'adolescent.
- En période aiguë, favoriser une diminution de la réaction inflammatoire, et par conséquent une réduction de l'œdème au niveau des rétrécissements, permettant ainsi le passage du chyme alimentaire et la régression possible des fistules.
- Obtenir le meilleur état nutritionnel possible si une intervention chirurgicale s'avère inévitable^{1,3,17-31}.

Recommandations alimentaires

La maladie de Crohn est une affection chronique évoluant par poussées et rémissions. Le traitement diététique suit ainsi son cours.

- En phase aiguë, il est impérieux de mettre l'intestin au repos et de remédier aux problèmes nutritionnels présents^{1,6,17-20}. Pour ce faire, l'on utilisera des formules nutritives de type monomérique administrées par voie entérale (oralement ou par tube) ou à l'alimentation par voie parentérale (partie 15). Une vaste documentation est disponible à ce sujet^{1,2,6,17-19,21,28,32-36}.
- Lorsque l'état du patient s'améliore, l'introduction d'un régime de transition est importante pour faciliter le passage de l'alimentation entérale à une alimentation dite normale. Une restriction des fibres alimentaires (chap. 16.6) s'avère nécessaire en présence de douleurs abdominales, diarrhées et saignements, mais surtout s'il y a rétrécissement intestinal¹. Certains fruits et légumes peuvent occasionner de la flatulence et des gaz, mais il est peu probable que ces produits puissent aggraver le processus inflammatoire². Il est recommandé d'éviter les aliments qui stimulent le péristaltisme intestinal, tels les pruneaux et les boissons contenant de la caféine³⁷.
- Certains patients peuvent bénéficier d'une restriction en lactose (chap. 16.21) puisqu'une intolérance au lactose a pour effet d'augmenter le volume et la fréquence des diarrhées et d'accentuer les malaises. Toutefois, avant d'imposer un régime alimentaire «strict» sans lactose, mieux vaut documenter une déficience en lactase en procédant à une épreuve de tolérance au lactose³⁸. Si l'on tient compte des différences ethniques, la fréquence de l'intolérance au lactose chez les patients atteints de la maladie de Crohn est similaire à celle que l'on observe dans la population bien portante^{6,38}.
- Dans les cas de stéatorrhée grave, le contenu en lipides du régime est diminué (chap. 16.17); l'utilisation de triglycérides à chaîne moyenne (huile MCT^{md}) peut s'avérer utile. La concentration des sels biliaires dans l'intestin proximal étant maximale le matin, les patients sont souvent en mesure d'ingérer plus de matières grasses à cette période de la journée^{1,12}.
- Des suppléments de vitamines (A,D,E,K, acide folique), de calcium, de magnésium et de fer sont nécessaires s'il y a une déficience clinique ou biochimique^{2,6,37}. Une attention particulière doit aussi être apportée au potassium sérique^{2,6}. La vitamine B₁₂ en injection parentérale est requise dans les

atteintes iléales extensives, à la suite d'une résection de ce segment et dans tous les cas de stagnation et de prolifération bactérienne du grêle. Chez ces patients, les résultats du test de Schilling sont souvent anormalement bas (chap.6.1)¹.

- En phase de rémission, le patient peut se remettre progressivement à un régime alimentaire normal, selon la tolérance, bien équilibré et riche en énergie et en protéines^{1,2,26,27,37}.

Il est inutile d'éliminer systématiquement un aliment pour lequel le patient ne démontre pas une intolérance évidente; ceci ne fait que contribuer aux déséquilibres nutritionnels. Dans le maintien de la rémission, les études contrôlées ne confirment pas les avantages d'un régime hyporésiduel ni d'un régime restreint en sucres raffinés et modérément enrichi en fibres³⁹⁻⁴¹. Toutefois, un régime normal excluant les aliments mal tolérés par les patients (régime d'exclusion) s'est avéré susceptible de prolonger la période de rémission^{31,42}. Les aliments les plus souvent incriminés étaient le blé, les produits laitiers, les cruciféracées (annexe H), le maïs, la levure, les fruits citrins, le café, les bananes, etc. Par ailleurs, le counseling diététique aide à améliorer les apports en protéines, en riboflavine, en vitamine C et à normaliser les taux de folacine sérique et la capacité de saturation de la transferrine^{43,44}. Une *approche individualisée*, fondée sur la *tolérance du patient*, est donc recommandée.

Problèmes particuliers

Obstruction Intestinale

Le rétrécissement d'un segment de l'intestin causé par l'œdème et l'inflammation peut exiger temporairement une restriction absolue de l'alimentation orale, puis une progression vers un régime modifié en consistance et restreint en fibres alimentaires (chap. 16.6)^{1,2}. Le drainage des sécrétions par tube nasogastrique et l'administration de médicaments sont des mesures adjuvantes précieuses. La sténose inflammatoire serrée avec fibrose requiert toujours une résection chirurgicale². Il est à noter qu'un taux de récurrence de plus de 50 % est observé après résection chirurgicale du segment atteint et qu'il ne s'agit donc pas d'un traitement définitif de la maladie⁵.

Fistules Intestinales

Les fistules aiguës ou chroniques, une complication difficile à traiter⁴⁵, peuvent être multiples et variées: périanales, périrectales, entérocutanées, entéro-entérales, entéro-vésicales, recto-vaginales. Les fistules entéro-entérales peuvent créer des problèmes nutritionnels majeurs en provoquant une stagnation du contenu intestinal et une prolifération bactérienne, et en diminuant la surface d'absorption à cause des dérivations¹. L'approche nutritionnelle pour le traitement des fistules externes (entérocutanées) est présentée dans le chapitre 5.8. Suivre un régime monomérique ou «mettre au repos» l'intestin, dans les cas de fistules de l'intestin grêle, ne donnent pas des résultats satisfaisants, et la chirurgie, bien que le soutien nutritionnel puisse être requis, semble être le traitement de choix et ne doit pas être retardée indûment⁴⁶.

Considérations particulières

- Une évaluation régulière de l'état nutritionnel et de l'apport

énergétique, et une connaissance approfondie de la maladie, de ses complications et du traitement médicamenteux permettent un suivi adéquat de ces patients.

- Le maintien d'un régime monomérique ou de l'alimentation par voie parentérale affecte souvent les patients sur le plan psychosocial^{1,2}. Afin d'améliorer la qualité de la vie et de permettre un mode de vie aussi normal que possible lors des périodes de récurrence, l'alimentation parentérale, infusée pendant douze heures la nuit soit en milieu hospitalier²⁵, soit à domicile³³, peut être utilisée: ce mode thérapeutique demande toutefois beaucoup de rigueur de la part de l'équipe traitante.
- La chronicité de la maladie, les exacerbations aiguës fréquentes, la répétition des hospitalisations et, dans certains cas, les interventions chirurgicales majeures requièrent beaucoup d'attention, d'empathie et d'appui sur le plan émotionnel de la part de l'équipe traitante^{1,3}.

Colite ulcéreuse

Définition

Atteinte inflammatoire superficielle d'étiologie inconnue, localisée au niveau du côlon à partir de l'anus, puis de façon rétrograde en partie ou en totalité jusqu'à la valvule iléo-caecale^{3,12,36}. Cliniquement, il est parfois difficile de distinguer entre la maladie de Crohn colique et la colite ulcéreuse³. Quand la distinction est impossible, on se contente de l'appellation de colite de type indéterminé^{6,36}.

Evolution clinique

Dans sa forme la plus grave, l'on observe une atteinte systémique, des signes de toxicité générale (ex.: fièvre, faiblesse, anorexie) et des effets catabolisants. Les douleurs abdominales sont fugaces mais démolisantes. Les diarrhées sanglantes provoquent l'anémie. De plus, l'ingestion est diminuée parce que l'alimentation régulière accentue les symptômes.

Initialement, la présentation clinique de la colite ulcéreuse est plus grave que celle de la maladie de Crohn, mais tend à s'atténuer, sauf dans certains cas, après les deux premières années d'évolution. Les récurrences sont relativement plus faciles à contrôler médicalement. Les complications locales sont similaires à celles décrites dans la maladie de Crohn mais moins fréquentes. Après dix ans d'évolution, la colite ulcéreuse est liée à une fréquence accrue du cancer du côlon^{3,6,12}. Cette prédisposition est moindre pour la maladie de Crohn.

Approche nutritionnelle

L'approche nutritionnelle de la colite ulcéreuse est similaire à celle recommandée pour le traitement de la maladie de Crohn. Il est à noter que la malabsorption liée à la colite ulcéreuse cliniquement établie est beaucoup moins importante puisque le grêle n'est pas touché. Cependant, l'alimentation parentérale semble peu efficace pour provoquer une rémission de la colite ulcéreuse^{19,30,32,47,48}. Il est important de tenir compte de l'anorexie et des problèmes émotionnels du patient³⁷.

Problèmes particuliers

Une colectomie avec iléostomie peut être indiquée: il s'agit alors d'un traitement définitif de la colite ulcéreuse. L'approche nutritionnelle pour les patients iléostomisés est présentée au chap. 14.7. Il est à souligner que les nouvelles techniques permettent d'éviter l'iléostomie définitive en préservant le segment rectal et en créant une anastomose iléo-rectale avec un réservoir pelvien (chap. 14.7 page 2)^{6,36,49,50}.

Références

1. Donaldson RM Jr. Crohn's disease. Dans: *Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*, vol 2.3^e éd, Siesenger MH, Fordtran JS (éd). Toronto: WB Saunders co, 1983, chap 66.
2. Farmer RG (éd). *Inflammatory bowel disease*. Clin Gastroenterol 9:231-476, 1980.
3. Kirsner JB, Shorter RG. Recent developments in «nonspecific» inflammatory bowel disease (First of two parts). N Engl J Med 306:775, 1982.
4. Kirsner JB, Shorter RG. Recent developments in «nonspecific» inflammatory bowel disease (Second of two parts). N Engl J Med 306:837, 1982.
5. Glickman RM, Isselbacher KJ. Affections du grêle. Dans: *Harrison Principes de médecine interne*, 4^e éd, Braunwald E, Isselbacher KJ, Pertersdorf RG et coll (éd). Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 1988, chap 238.
6. Berk JE, Haubrich WS, Kaiser MH et coll (éd.) *Bockus Gastroenterology*, vol 4, 4^e éd. Toronto: WB Saunders Co, 1985.
7. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. Gastroenterology 70:439, 1976.
8. Sitrin MD, Rosenberg IH, Chawla K et coll. Clinical conference: Nutritional and metabolic complications in a patient with Crohn's disease and ileal resection. Gastroenterology 78:1069, 1980.
9. Hodges PE, Thomson ABR. Nutritional status of patients with Crohn's disease: Part I. J Can Diet Assoc 43: 100, 1982.
10. Hodges PE, Thomson ABR. Nutritional status of patients with Crohn's disease: Part II. J Can Diet Assoc 43: 194, 1982.
11. Hodges PE, Gee M, Grace M, Thomson ABR. Vitamin and iron intake in patients with Crohn's disease. J Am Diet Assoc 84:52, 1984.
12. Siesenger MH (éd). Malabsorption and nutritional support. Clin Gastroenterol 12: 323-610, 1983.
13. Warsaw AL, Waldman TA, Laster L. Protein-losing enteropathy and malabsorption in regional enteritis. Ann Surg 178:578, 1973.
14. Linaker BD. Scurvy and vitamin C deficiency in Crohn's disease. Postgrad Med J 55:26, 1979.
15. Mac Clain C, Soutor C, Zieve L. Zinc deficiency: A complication of Crohn's disease. Gastroenterology 78:272, 1980.
16. Chan ATH, Flemming CR, O'Fallon WM et coll. Estimated versus measured basal requirements in patients with Crohn's disease. Gastroenterology 91:57, 1986.
17. O'Morain C, Segal AV, Levi AJ. Elemental diets in treatment of acute Crohn's disease. Br Med 281:1173, 1980.
18. Müller JM, Keller HW, Erasmii H, Pichlmaier H. Total parenteral nutrition as the sole therapy in Crohn's disease: A prospective study. Br J Surg 70: 40, 1983.
19. Elson CO, Layden TJ, Nemchausky BA et coll. An evaluation of total parenteral nutrition in the management of inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci 25:42, 1980.
20. Driscoll RH, Rosenberg IH. Total parenteral nutrition in inflammatory bowel disease. Med Clin North Am 62:185, 1978.
21. Morin CL, Roulet M, Roy CC, Weber A. Continuous elemental enteral alimentation in children with Crohn's disease and growth failure. Gastroenterology 79: 1205, 1980.
22. Steffee PW, Shipps BT. Improvement of Crohn fistulas with a peptide diet. Clin Ther 43:280, 1980.
23. Calam J, Crooks EP, Walker JR. Elemental diets in the management of Crohn's perianal fistulae. JPEN 4:4, 1980.
24. Kirschner BS, Klich RJ, Kalman SS et coll. Reversal of growth retardation in Crohn's disease with therapy emphasizing oral nutritional restitution. Gastroenterology 80:10, 1981.
25. Matuchansky C, Morichau-Beauchant M, Druart F, Tapin J. Cyclic (nocturnal) total parental nutrition in hospitalized adult patients with severe digestive diseases: Report of a prospective study. Gastroenterology 81:433, 1981.
26. Harries AD, Danis V, Heatley RV et coll. Controlled trial of supplemented oral nutrition in Crohn's disease. Lancet 1:887, 1983.

27. Brignola C, Lanfranchi GA, Pasquali R et coll. Calorie supplementation and Crohn's disease. *Lancet* 2:47, 1983.
28. Logan RFA, Gillon J, Ferington C, Ferguson A. Reduction of gastrointestinal protein loss by elemental diet in Crohn's disease of the small bowel. *Gut* 22:383, 1981.
29. Layden T, Rosenberg J, Nemchausky B et coll. Reversal of growth arrest in adolescents with Crohn's disease after parenteral alimentation. *Gastroenterology* 70: 1017, 1976.
30. Reilly J, Ryan JA, Strole W, Fisher JE. Hyperalimentation in inflammatory bowel disease. *Am J Surg* 131:192, 1976.
31. Jones VA, Dickinson RJ, Workman E et coll. Crohn's disease: Maintenance of remission by diet. *Lancet* 2:177, 1985.
32. Dickinson RJ, Ashton MG, Axon ATR et coll. Controlled trial of intravenous hyperalimentation and total bowel rest as an adjunct to the routine therapy of acute colitis. *Gastroenterology* 79:1199, 1980.
33. Fleming CR, McGill DB, Berkner S. Home parenteral nutrition as primary therapy in patients with extensive Crohn's disease of the small bowel and malnutrition. *Gastroenterology* 73:1077, 1977.
34. Strobel CT, Byrne WJ, Ament ME. Home parenteral nutrition in children with Crohn's disease: An effective management alternative. *Gastroenterology* 77:272, 1979.
35. Whittaker JS. Nutritional therapy of hospitalized patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sciences* 32(12): 89S, 1987.
36. Sanderson IR. Chronic inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol* 15:71, 1986.
37. Zeman FJ. *Clinical Nutrition and Dietetics*, 2^e éd. Toronto: Collier Macmillan, Inc, 1991, chap 8.
38. Kirschner BS, De Favaro MV, Jensen W. Lactose malabsorption in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 81: 829, 1981.
39. Heaton KW, Thornton JR, Emmet PM. Treatment of Crohn's disease with an unrefined-carbohydrate, fibre-rich diet. *Br Med J* 2:764, 1979.
40. Levenstein S, Prantera C, Luzi C et coll. Low residue or normal diet in Crohn's disease: A prospective controlled study in Italian patients. *Gut* 26:989, 1985.
41. Ritchie JC, Wadsworth, Lennard-Jones JE et coll. Controlled multicenter therapeutic trial of an unrefined carbohydrate, fibre rich diet in Crohn's disease. *Br Med J* 295:517, 1987.
42. Jones VA. Comparison of total parenteral nutrition and elemental diet in induction of remission of Crohn's disease: Longterm maintenance of remission by personalized food exclusion diets. *Dig Dis Sci* 32: 100S, 1987.
43. Imes S, Pinchbeck BR, Thompson ABR. Diet counseling modifies nutrient intake of patients with Crohn's disease. *J Am Diet Assoc* 87:457, 1987.
44. Imes S, Pinchbeck BR, Dinwoodie A et coll. Iron, folate, vitamine B₁₂, zinc and copper status in out-patients with Crohn's disease: Effect of diet counseling. *J Am Diet Assoc* 87:928, 1987.
45. Levine GM. Nutritional support in gastrointestinal disease. *Surg Clin North Am* 81(3): 701, 1981.
46. Hill GL, Bouchier RG, Witney GB. Surgical and metabolic management of patients with external fistulas of the small intestine associated with Crohn's disease. *World J Surg* 12:191, 1988.
47. Seashore JH, Hillemeier AC, Gryboski JD. Total parenteral nutrition in the management of inflammatory bowel disease in children: A limited role. *Am J Surg* 143:504, 1982.
48. Ste-Marie M. Symposium on the treatment of inflammatory bowel disease in children and adolescents. 2. Nutritional Therapy. *Can J Surg* 25:495, 1982.
49. Coran AG. Symposium on the treatment of inflammatory bowel disease in children and adolescents. 3. Surgical Management of Ulcerative Colitis. *Can J Surg* 25:498, 1982.
50. Cohen Z, Mc Loed RS. Proctocolectomy and ileoanal anastomosis with J-shaped ileal pouch. *World J Surg* 12:164, 1988.

Ressource

- Fondation canadienne pour l'iléite et la colite
Edifice Sun Life
1155, rue Metcalfe
Bureau 41
Montréal (Québec)
H3B 2V6
[REDACTED]

12.8 FIBROSE KYSTIQUE

- Définition
- Critères diagnostiques
- Approche nutritionnelle
 - Buts
 - Stratégie
 - Recommandations alimentaires
 - 1. Énergie
 - 2. Lipides
 - 3. Vitamines et minéraux
 - 4. Alimentation du nourrisson
 - 5. Alimentation de l'enfant d'âge préscolaire
 - 6. Alimentation de l'enfant plus âgé
 - Considérations particulières
 - Suppléments nutritifs nocturnes
 - Diabète
- Références
- Ressource

Définition¹⁻³

Maladie^a héréditaire à transmission autosomale récessive se manifestant par une dysfonction généralisée des glandes exocrines. Un enfant sur 2000 en est atteint et une personne sur 20 est porteuse du gène. Cette maladie est répandue dans la population caucasienne (blanche) et presque inexistante dans la population noire africaine ou asiatique. Les signes cliniques, qui sont causés par une augmentation de la viscosité du mucus, comprennent principalement:

- atteinte pulmonaire: infections respiratoires à répétition, bronchiectasie, fibrose pulmonaire, insuffisance pulmonaire chronique;
- atteinte pancréatique: stéatorrhée, selles anormales, huileuses et abondantes, retard de croissance, poids sous la normale, malnutrition protéino-énergétique avec risque de déficience vitaminique, perte de l'activité enzymatique des sécrétions pancréatiques chez plus de 80 % des sujets.

Critères diagnostiques

- Manifestations pulmonaires ou gastro-intestinales typiques.
- Le diagnostic est confirmé par le dosage du chlore dans la sueur. Une valeur supérieure à 60 mmol/L est nécessaire pour poser le diagnostic³.

^a Également désignée sous l'appellation de mucoviscidose.

Approche nutritionnelle

Buts

- Obtenir un développement staturo-pondéral normal (100 % du poids désirable pour la taille) afin de diminuer le nombre et la gravité des infections et peut-être éviter la détérioration de la fonction pulmonaire.
- Prévenir le développement de certains symptômes cliniques et complications (ex.: hyponatrémie chez le nourrisson, malaises digestifs) en fournissant les suppléments nutritionnels appropriés.

Stratégie

Fournir à l'enfant un régime riche en énergie, protéines, glucides et lipides (chap. 16.13).

Environ 90 % des personnes atteintes de fibrose kystique nécessitent des suppléments d'enzymes pancréatiques aux repas et aux collations.

Recommandations alimentaires

1. Énergie

Les besoins énergétiques sont accrus à la suite de la malabsorption et de l'augmentation des dépenses en énergie causée par les infections pulmonaires⁴. Les besoins réels seraient d'environ 130 à 200 % des apports énergétiques recommandés^{2,5-9}.

2. Lipides

Les lipides ont été traditionnellement exclus du régime des malades qui souffrent de fibrose kystique en raison de la distension abdominale et de la diarrhée avec perte de nutriments qu'ils pouvaient causer. Cependant, avec l'utilisation des suppléments d'enzymes pancréatiques sous forme de microsphères enrobées de matériel résistant aux acides qui assurent une meilleure utilisation des graisses, les lipides sont maintenant considérés comme une excellente source d'énergie pour prévenir la malnutrition et les retards de croissance, ainsi que la déficience en acides gras essentiels^{2,10}. Un apport représentant jusqu'à 40 % de l'énergie serait bien toléré chez la majorité des sujets^{1,10}. Le remplacement enzymatique diminue, mais ne normalise pas les quantités de lipides et d'azote excrétées dans les fèces³.

3. Vitamines et minéraux

L'on recommande certains suppléments de vitamines et minéraux pour les malades qui souffrent de fibrose kystique, particulièrement à cause de la malabsorption des vitamines liposolubles (tableau 12.8-1)^{2,4}.

4. Alimentation du nourrisson

- Pour les nourrissons, l'on fait les recommandations suivantes:
- éviter les laits de faible teneur en sodium (tel le SMA^{md}) (annexe I);
 - ajouter du sel aux légumes et aux viandes, surtout lors des grosses chaleurs, afin de prévenir l'hyponatrémie;
 - pour les nourrissons qui sont uniquement nourris au lait, don-

ner, lors des chaleurs d'été, de l'eau salée (1 mL de sel dans 60 mL d'eau) à l'aide d'une seringue, au rythme de 5 mL une ou deux fois par jour.

Pour les bébés de petits poids, on ajoute les recommandations suivantes:

- offrir un lait concentré en énergie, soit environ 350-440 kJ/dL (85-105 kcal/dL), en ajoutant au besoin un polymère de glucose et de l'huile de tournesol;
- introduire les fruits avant les légumes;
- ajouter du sucre aux fruits et aux céréales;
- ajouter 5 mL d'huile ou de beurre à la viande ou aux légumes.

Tableau 12.8-1
Suppléments recommandés pour les malades souffrant de fibrose kystique

Nutriments	Indications	Doses recommandées
Vitamine A	Tous les patients	900-1 800 ER (5000-10000 UI)
Vitamine D	Tous les patients	20 µg (800 UI)
Vitamine E	Tous les patients	200 mg (200 UI)
Vitamine K	Thérapie antibiotique et maladie du foie	5 mg par 3 jours
Vitamine B ₁₂	Résection iléale	100 mg IM/mois
Acide folique, autres vitamines du groupe B et vitamine C	Thérapie antibiotique et maladie du foie	selon les ANR
Sodium	Première année de vie Exercice violent ou chaleur importante	23 mmol (1,3 g NaCl) 73 mmol (4 g NaCl)
Zinc	Patient avec retard de croissance ou diarrhée et dont le niveau plasmatique n'est pas disponible	15 mg de Zn élémentaire (75 mg de ZnSO ₄)

D'après la référence 8.

5. Alimentation de l'enfant d'âge préscolaire

Les recommandations faites aux parents d'enfants de deux à cinq ans doivent être proposées avec beaucoup de prudence. Tout en recommandant un régime riche en énergie, l'on doit expliquer qu'il est normal et inévitable que l'enfant ait occasionnellement moins d'appétit. La ou le diététiste doit apporter un soutien aux parents et les aider à surmonter leur panique.

Quelques conseils pratiques peuvent s'avérer utiles:

- manger dans une atmosphère calme;
- servir de petites portions et attendre que l'enfant en redemande;
- offrir des aliments concentrés en énergie;
- donner des aliments que l'enfant aime tout en gardant un menu équilibré;
- éviter le chantage et les commentaires.

6. Alimentation de l'enfant d'âge préscolaire

- Etablir avec les parents et l'enfant un minimum de ce que celui-ci est capable de consommer sous forme d'aliments réguliers.

- Donner une liste d'aliments de haute teneur énergétique et faire des recommandations afin d'augmenter la valeur énergétique de l'alimentation (chap. 16.13).
- Ajouter des boissons riches en énergie et en protéines (une ou deux par jour) telles que le lait fouetté et le lait de poule.
- Compléter avec un polymère de glucose (ex.: Polycose^{md}) ou des suppléments commerciaux liquides.

Considérations particulières

Suppléments nutritifs nocturnes

Certains groupes recommandent, pour les patients qui ne réussissent pas à maintenir un poids suffisant, d'administrer des suppléments nutritifs par tube nasogastrique, par gastrostomie ou jéjunostomie durant la nuit dans le but de ramener le poids à la normale et d'améliorer la qualité de vie, tout en espérant la prolonger. Les résultats obtenus avec cette méthode montrent qu'on peut réussir à ramener le poids à la normale^{11,12}.

Diabète

Un diabète secondaire à l'atteinte pancréatique peut se manifester dans 1 à 2 % des cas. Le diabète est en général peu sévère et la glycémie, facile à contrôler³. L'on recommande de maintenir l'apport alimentaire élevé, tout en évitant de donner des sucres d'absorption rapide en trop grande quantité.

Références

1. Silverman A, Roy CC. Pediatric Clinical Gastroenterology, 3^e éd. Toronto: Mosby, 1983, chap 27.
2. Shepherd RW, Holt TL, Thomas J et coll. Malnutrition in cystic fibrosis: The nature of the nutritional deficit and optimal management. Nutr Abstr Rev 54:1009, 1984.
3. Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL. Cystic fibrosis. Dans: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6^e éd, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (éd). Montréal: McGraw-Hill, Inc, 1989, chap 108.
4. Krause MV, Mahan LK. Food, Nutrition and Diet Therapy, 7^e éd. Toronto: WB Saunders Co, 1984, chap 38.
5. O'Laughlin E, Forbes D, Parsons H et coll. Nutritional rehabilitation of malnourished patients with cystic fibrosis. Am J Clin Nutr 43:732, 1986.
6. Parsons HG, Beaudry P, Dumas A, Pencharz PB. Energy needs and growth in children with cystic fibrosis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2:44, 1983.
7. Shepherd RW, Thomas BJ, Bennett D et coll. Changes in body composition and muscle protein degradation during nutritional supplementation in nutritionally growth-retarded children with cystic fibrosis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2:439, 1983.
8. Roy CC, Weber AM. Nutrition of the child with cystic fibrosis. Dans: Nutrition in Pediatrics: Basic Science and Clinical Aspects, Walker A, Watkins JB (éd). New York: Little Brown Co, 1984, pp 341-382.
9. Hubbard VS, Mangrum PJ. Energy intake and nutrition counseling in cystic fibrosis. J Am Diet Assoc 80:127, 1982.
10. Pencharz PB. Energy intakes and low-fat diets in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2:400, 1983.

ner, lors des chaleurs d'été, de l'eau salée (1 mL de sel dans 60 mL d'eau) à l'aide d'une seringue, au rythme de 5 mL une ou deux fois par jour.

Pour les bébés de petits poids, on ajoute les recommandations suivantes:

- offrir un lait concentré en énergie, soit environ 350-440 kJ/dL (85-105 kcal/dL), en ajoutant au besoin un polymère de glucose et de l'huile de tournesol;
- introduire les fruits avant les légumes;
- ajouter du sucre aux fruits et aux céréales;
- ajouter 5 mL d'huile ou de beurre à la viande ou aux légumes.

Tableau 12.8-1
Suppléments recommandés pour les malades souffrant de fibrose kystique

Nutriments	Indications	Doses recommandées
Vitamine A	Tous les patients	900-1 800 ER (5000-10000 UI)
Vitamine D	Tous les patients	20 µg (800 UI)
Vitamine E	Tous les patients	200 mg (200 UI)
Vitamine K	Thérapie antibiotique et maladie du foie	5 mg par 3 jours
Vitamine B ₁₂	Réssection iléale	100 mg IM/mois
Acide folique, autres vitamines du groupe B et vitamine C	Thérapie antibiotique et maladie du foie	selon les ANR
Sodium	Première année de vie	23 mmol (1,3 g NaCl)
	Exercice violent ou chaleur importante	73 mmol (4 g NaCl)
Zinc	Patient avec retard de croissance ou diarrhée et dont le niveau plasmatique n'est pas disponible	15 mg de Zn élémentaire (75 mg de ZnSO ₄)

D'après la référence 8.

5. Alimentation de l'enfant d'âge préscolaire

Les recommandations faites aux parents d'enfants de deux à cinq ans doivent être proposées avec beaucoup de prudence. Tout en recommandant un régime riche en énergie, l'on doit expliquer qu'il est normal et inévitable que l'enfant ait occasionnellement moins d'appétit. La ou le diététiste doit apporter un soutien aux parents et les aider à surmonter leur panique.

Quelques conseils pratiques peuvent s'avérer utiles:

- manger dans une atmosphère calme;
- servir de petites portions et attendre que l'enfant en redemande;
- offrir des aliments concentrés en énergie;
- donner des aliments que l'enfant aime tout en gardant un menu équilibré;
- éviter le chantage et les commentaires.

6. Alimentation de l'enfant d'âge préscolaire

- Etablir avec les parents et l'enfant un minimum de ce que celui-ci est capable de consommer sous forme d'aliments réguliers.

- Donner une liste d'aliments de haute teneur énergétique et faire des recommandations afin d'augmenter la valeur énergétique de l'alimentation (chap. 16.13).
- Ajouter des boissons riches en énergie et en protéines (une ou deux par jour) telles que le lait fouetté et le lait de poule.
- Compléter avec un polymère de glucose (ex.: Polycose^{md}) ou des suppléments commerciaux liquides.

Considérations particulières

Suppléments nutritifs nocturnes

Certains groupes recommandent, pour les patients qui ne réussissent pas à maintenir un poids suffisant, d'administrer des suppléments nutritifs par tube nasogastrique, par gastrostomie ou jéjunostomie durant la nuit dans le but de ramener le poids à la normale et d'améliorer la qualité de vie, tout en espérant la prolonger. Les résultats obtenus avec cette méthode montrent qu'on peut réussir à ramener le poids à la normale^{11,12}.

Diabète

Un diabète secondaire à l'atteinte pancréatique peut se manifester dans 1 à 2 % des cas. Le diabète est en général peu sévère et la glycémie, facile à contrôler³. L'on recommande de maintenir l'apport alimentaire élevé, tout en évitant de donner des sucres d'absorption rapide en trop grande quantité.

Références

1. Silverman A, Roy CC. Pediatric Clinical Gastroenterology, 3^e éd. Toronto: Mosby, 1983, chap 27.
2. Shepherd RW, Holt TL, Thomas J et coll. Malnutrition in cystic fibrosis: The nature of the nutritional deficit and optimal management. Nutr Abstr Rev 54:1009, 1984.
3. Boat TF, Welsh MJ, Beaudet AL Cystic fibrosis. Dans: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6^e éd, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (éd). Montréal: McGraw-Hill, Inc, 1989, chap 108.
4. Krause MV, Mahan LK. Food, Nutrition and Diet Therapy, 7^e éd. Toronto: WB Saunders Co, 1984, chap 38.
5. O'Laughlin E, Forbes D, Parsons H et coll. Nutritional rehabilitation of malnourished patients with cystic fibrosis. Am J Clin Nutr 43:732, 1986.
6. Parsons HG, Beaudry P, Dumas A, Pencharz PB. Energy needs and growth in children with cystic fibrosis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2:44, 1983.
7. Shepherd RW, Thomas BJ, Bennett D et coll. Changes in body composition and muscle protein degradation during nutritional supplementation in nutritionally growth-retarded children with cystic fibrosis. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2:439, 1983.
8. Roy CC, Weber AM. Nutrition of the child with cystic fibrosis. Dans: Nutrition in Pediatrics: Basic Science and Clinical Aspects, Walker A, Watkins JB (éd). New York: Little Brown Co, 1984, pp 341-382.
9. Hubbard VS, Mangrum PJ. Energy intake and nutrition counseling in cystic fibrosis. J Am Diet Assoc 80:127, 1982.
10. Pencharz PB. Energy intakes and low-fat diets in children. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2:400, 1983.