

Université de Montréal

**Etude du métabolisme des rétinoïdes dans le modèle de restriction alimentaire
au cours du vieillissement chez le rat**

par

Stéphanie Chevalier

Département de Nutrition
Faculté de Médecine

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

juin, 1997

©Stéphanie Chevalier, 1997



QU
145
U58
1998
V.003

Université de Montréal

Étude du métabolisme des rétinoides dans le modèle de restriction alimentaire
au cours du vieillissement chez le rat

par

Stéphane Lévesque

Département de Nutrition
École de Médecine

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

juin 1997



Stéphane Lévesque, 1997

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Etude du métabolisme des rétinoïdes dans le modèle de restriction alimentaire
au cours du vieillissement chez le rat

présentée par:

Stéphanie Chevalier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Emile Lévy	président du jury
Dr Beatriz Tuchweber	directrice de recherche
Dr André Lacroix	membre du jury
Dr Philip Spear	examineur externe
	représentant du doyen

Thèse acceptée le: 29.04.1998

SOMMAIRE

A ce jour, la restriction alimentaire sans malnutrition est reconnue comme le seul moyen expérimental, robuste et reproductible, qui parvient à augmenter la durée de vie moyenne et maximale de plusieurs espèces animales. Cette simple stratégie nutritionnelle retarde l'apparition de pathologies et le déclin sénile de nombreuses fonctions physiologiques, permettant ainsi l'étude des causes et conséquences du vieillissement en l'absence de pathologies confondantes. Des études préliminaires laissent présager une modulation du métabolisme des rétinoïdes par la restriction alimentaire. Par leur implication dans diverses fonctions essentielles, dont la différenciation cellulaire, par la régulation de l'expression des gènes via leur liaison à des récepteurs nucléaires, les rétinoïdes offrent une avenue de recherche d'intérêt. La présente recherche a été entreprise dans le but d'étudier quelques aspects du métabolisme des rétinoïdes, soient l'entreposage hépatique, l'absorption intestinale et le transport plasmatique, tels qu'influencés par la restriction alimentaire au cours du vieillissement. Les travaux ont été effectués chez des rats femelles nourris à volonté (AL) ou soumis à deux types de restriction alimentaire, soit une restriction de la diète complète (DR) et l'autre, une restriction des macronutriments uniquement (DR⁺), afin de distinguer les effets d'un apport énergétique réduit des effets de l'état nutritionnel en vitamine A.

Les résultats démontrent d'abord une accumulation graduelle des rétinoïdes au niveau du foie, avec l'âge; accumulation d'autant plus marquée chez les rats DR⁺. Chez les rats AL, cette accumulation des rétinoïdes hépatiques n'a pu être associée à une augmentation de l'absorption intestinale du rétinol, au cours du vieillissement, telle que mesurée par transport lymphatique. Cette technique a cependant permis de mettre en évidence un ralentissement important du débit lymphatique, chez les rats vieillissants. Au contraire des rats AL, l'absorption lymphatique du rétinol supérieure des rats DR⁺ pourrait contribuer à leur contenu hépatique augmenté. Le débit lymphatique supérieur des rats soumis à la restriction alimentaire représente une part de l'explication de

l'absorption intestinale plus grande, mais il semble que l'apport prolongé en vitamine A, supérieure chez les rats DR⁺, relativement à leur poids corporel, puisse aussi y contribuer.

Les taux sanguins de rétinol-RBP ont été réduits de près de la moitié, chez les rats DR et DR⁺, suggérant un effet de l'apport énergétique globalement diminué, alors que ces taux n'ont pas été affectés par le vieillissement. Par opposition, ni la DR, ni le vieillissement n'ont influencé les taux de TTR sanguins. Cette baisse de la rétinolémie n'a pu être associée à une disponibilité réduite du rétinol hépatique à sa mise en circulation, lié à la RBP. En effet, l'activité des retinyl ester hydrolases neutre et acide (responsables de l'hydrolyse des retinyl esters en rétinol) n'a pas été corrélée aux taux de rétinol sanguins et surtout, le rétinol libre était retrouvé en excès molaire par rapport la RBP, dans le foie. Cependant, les niveaux hépatiques de RBP ont diminué graduellement avec l'âge, et de façon encore plus marquée chez les rats DR et DR⁺, suggérant fortement une perturbation de la synthèse de la protéine, chez ces derniers. En revanche, les taux hépatiques d'ARNm de la RBP n'ont pas été modulés par l'âge ou la diète, ni d'ailleurs les taux d'ARNm de TTR et de CRBP. La divergence entre l'expression du gène et de la protéine RBP suggère une perturbation de sa synthèse au niveau post-transcriptionnel et/ou une dégradation accélérée spécifique de cette protéine, par la restriction alimentaire.

Enfin, la biotransformation du rétinol en acide rétinoïque, telle que démontrée par une élévation marquée des taux sanguins d'acide rétinoïque, est suggérée chez les rats soumis à la restriction alimentaire. Une production supérieure du métabolite actif du rétinol par la restriction alimentaire pourrait expliquer diverses observations effectuées au cours de ces travaux et de façon spéculative, plusieurs actions bénéfiques de cette approche nutritionnelle.

En somme, les travaux présentés ici décrivent la modulation, par la restriction alimentaire, de plusieurs aspects du métabolisme des rétinoïdes, dont l'absorption

intestinale, l'homéostasie de la rétinolémie et la synthèse hépatique de la RBP. Malgré des taux de rétinol-RBP sanguins considérablement réduits, normalement indicatifs d'une déficience en vitamine A, le rétinol semble transporté efficacement aux tissus périphériques des rats soumis à la restriction alimentaire. Ces animaux ne présentent aucun signe d'une telle déficience et qui plus est, ils vivent plus longtemps et présentent moins de pathologies que leurs contrôles nourris à volonté. En substance, ce travail décrit une nouvelle action métabolique de la restriction alimentaire, pouvant être reliée à ses effets bénéfiques, et grâce à cette simple intervention nutritionnelle, il apporte des vues originales du métabolisme des rétinoïdes.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Beatriz Tuchweber pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et guidée, avec toute l'expérience qu'elle possède, tout au long de mes études doctorales. Son optimisme et son enthousiasme scientifique seront toujours pour moi des sources d'inspiration.

Je voudrais remercier également le Dr. William S. Blaner, de l'Université Columbia, de m'avoir offert un stage des plus formateurs dans son laboratoire ainsi que sa précieuse collaboration.

Mes sincères remerciements vont aussi aux Dr. André Lacroix et Pangala V. Bhat, du Centre de recherche de l'Hôtel-Dieu, pour avoir mis à ma disposition l'équipement de leur laboratoire et promulgué de judicieux conseils.

Je remercie le fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche, l'Ordre des Diététistes du Québec et le Département de Nutrition pour leur appui financier.

Je ne saurais passer sous silence la précieuse aide des assistants de recherche, Maurice Audet, Aline Perea, Guylaine Gévry et Roseann Piantedosi, qui m'ont enseigné de nombreuses techniques et grandement facilité l'exécution de mon travail.

A mes collègues de travail, Claude Barriault, Guylaine Bouchard, Marie-Josée LeBlanc et Abdelhamid Kerkadi, un grand merci pour la présence, l'aide et le support amical qu'ils m'ont apportés à chaque jour.

Je tiens à remercier chaleureusement ma mère, Murielle Pépin et mon ami, Thierry Brun, pour leur aide dévouée à la préparation de ce manuscrit.

J'offre toute ma gratitude à ma famille, à tous mes amis et particulièrement, à Philippe d'avoir su si bien m'appuyer au cours de ces années. Sans leur soutien, un tel projet n'aurait pu être accompli si agréablement.

A mes parents

TABLE DES MATIERES

	<u>page</u>
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES ABBREVIATIONS	xvii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION: REVUE DE LA LITTERATURE	
1. Fonctions et métabolisme de la vitamine A	1
1.1 Définition et structure	1
1.2 Fonctions	2
1.3 Absorption intestinale	3
1.3.1 Hydrolyse intra-luminale	4
1.3.2 Captage du rétinol par les entérocytes	5
1.3.3 Estérification et incorporation dans les chylomicrons	6
1.3.4 Transport lymphatique	9
1.4 Métabolisme hépatique	9
1.4.1 Hydrolyse des esters de rétinol	10
1.4.2 Transfert du rétinol de l'hépatocyte à la cellule étoilée	12
1.4.3 Estérification et mise en réserve	13
1.4.4 Mobilisation du rétinol	16
1.5 Transport plasmatique	17
1.5.1 Protéine de transport plasmatique	17
1.5.1.1 Structure	18
1.5.1.2 Synthèse hépatique et extra-hépatique	18

	<u>page</u>
1.5.1.3 Régulation de la synthèse	19
1.5.1.4 Formation du complexe de transport	21
1.5.2 Recyclage et utilisation du rétinol	22
1.5.3 Régulation de la rétinolémie	23
1.6 Métabolisme cellulaire	28
1.6.1 Entrée du rétinol dans les cellules-cibles	28
1.6.2 Formation et métabolisme de l'acide rétinoïque	30
1.6.2.1 Voie d'oxydation du rétinol	31
1.6.2.2 Métabolites de l'acide rétinoïque	32
1.6.3 Rôles des protéines de transport intracellulaire	34
1.7 Rétinoïdes et expression des gènes	39
1.7.1 Récepteurs nucléaires pour l'acide rétinoïque	39
1.7.2 Gènes modulés par l'acide rétinoïque	42
2. Restriction alimentaire et vieillissement	44
2.1 Théories du vieillissement	44
2.2 Modulation nutritionnelle du vieillissement: modèle de restriction alimentaire	46
2.2.1 Description du modèle	47
2.2.1.1 Consommation alimentaire	47
2.2.1.2 Effets sur la longévité et les pathologies associées au vieillissement	49

	<u>page</u>
2.2.2 Mécanismes d'actions proposés	52
2.2.2.1 Expression des gènes, réparation de l'ADN, turnover protéique et apoptose	54
2.2.2.2 Réponse immune	56
2.2.2.3 Théorie neuro-endocrine	56
2.2.2.4 Production de radicaux libres et détoxification	58
2.3 Influence de la restriction alimentaire et du vieillissement sur le métabolisme des rétinoïdes	60
2.3.1 Absorption intestinale	60
2.3.2 Entreposage hépatique	61
2.3.3 Niveaux sanguins	62
3. But de la présente étude	63
CHAPITRE 2. ARTICLE I	65
Avant-propos I	66
Abstract	68
Introduction	69
Materials and methods	69
Results	71
Discussion	75
References	79

	<u>page</u>
CHAPITRE 3. ARTICLE II	81
Avant-propos II	82
Abstract	85
Introduction	86
Materials and methods	87
Results	89
Discussion	95
References	98
CHAPITRE 4. ARTICLE III	101
Avant-propos III	102
Abstract	104
Introduction	105
Materials and methods	106
Results	109
Discussion	120
References	125
CHAPITRE 5. DISCUSSION GENERALE	129
5.1 Effets de la restriction alimentaire et de l'âge sur le poids corporel et le poids des organes	129
5.2 Effets de la restriction alimentaire et de l'âge sur la mise en réserve hépatique et périphérique des rétinoïdes	130

5.3	Absorption intestinale du rétinol	131
5.3.1	Effet du vieillissement	131
5.3.2	Effet de la restriction alimentaire	133
5.4	Effets de la restriction alimentaire et de l'âge sur le transport plasmatique du rétinol	135
5.4.1	Protéine de transport intracellulaire du rétinol	136
5.4.2	Transthyréine	136
5.4.3	Retinyl ester hydrolases	137
5.4.4	Protéine de transport plasmatique	139
5.4.5	Voies alternatives	140
5.4.6	Modulation par l'acide rétinoïque	141
	CONCLUSION	143
	BIBLIOGRAPHIE	146
	ANNEXES	xviii

LISTE DES FIGURES

	<u>page</u>
Chapitre 1. Revue de la littérature	
Figure 1: Structure de la vitamine A	2
Figure 2: Absorption intestinale	8
Figure 3: Métabolisme hépatique	15
Figure 4: Régulation rétroactive de la rétinolémie par l'acide rétinoïque	27
Figure 5: Modèle de régulation du métabolisme des rétinoïdes par les protéines de transport intracellulaire	37
Figure 6: Gènes des récepteurs pour l'acide rétinoïque	40
Figure 7: Contrôle de l'expression des gènes par les rétinoïdes	42
Figure 8: Courbes de survie des rats soumis à la restriction alimentaire	49
 Chapitre 2. Article I	
Figure 1: Body weights of controls with free access to food (AD LIB) and dietary restricted (DR) rats	72

Chapitre 3. Article II

- Figure 1: Lymph flow 91
- Figure 2. Lymphatic retinol absorption 93

Chapitre 4. Article III

- Figure 1: Effect of age and dietary restriction on plasma retinol levels in young, mature, and old rats 112
- Figure 2: Effect of age and dietary restriction on liver acid and neutral retinyl ester hydrolases in young, mature, and old rats 116
- Figure 3: Effect of age and dietary restriction on plasma RBP, liver RBP, plasma TTR, and liver TTR levels in young, mature, and old rats. 118
- Figure 4: Effect of age and dietary restriction on liver RBP, TTR, CRBP, and β -actin mRNA expression in young, mature, and old rats. 119

LISTE DES TABLEAUXpage**Chapitre 1. Revue de la littérature**

Tableau 1: Quelques gènes modulés par l'acide rétinoïque	43
Tableau 2: Modulation par la restriction alimentaire de quelques modifications biologiques reliées à l'âge	52

Chapitre 2. Article I

Table 1: Organ weights of AD LIB and DR rats	72
Table 2: Retinoids in plasma and liver of AD LIB and DR rats	74
Table 3: Distribution of liver retinoids in AD LIB and DR rats	74
Table 4: Total retinoids in peripheral organs of AD LIB and DR rats	75

Chapitre 3. Article II

Table 1: Body weight, intestine weight and length	90
Table 2: Bile flow	92
Table 3: Liver and plasma retinoids	94

Chapitre 4. Article III

Table 1: Body and organ weights of young, mature, and old rats fed ad libitum or dietary restricted	110
Table 2: Tissue retinoid concentrations of young, mature, and old rats fed ad libitum or dietary restricted	113
Table 3: Plasma retinoic acid levels of young, mature, and old rats fed ad libitum or dietary restricted	114

LISTE DES ABBREVIATIONS

ARAT	acyl CoA:retinol acyltransferase
ADH	alcohol dehydrogenase
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN_m	acide ribonucléique messenger
CEH	cholesteryl ester hydrolase
CRABP I	cellular retinoic acid-binding protein type I
CRABP II	cellular retinoic acid-binding protein type II
CRBP ou	cellular retinol-binding protein type I
CRBP I	
CRBP II	cellular retinol-binding protein type II
DR	dietary restriction
DR⁺	dietary restriction (enrichie en micronutriments)
HRP	<i>N</i> -(4-hydroxyphenyl)retinamide
LRAT	lecithin:retinol acyltransferase
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
PPAR	peroxisome proliferating-activated receptor
RaIDH	retinal dehydrogenase
RAR	retinoic acid receptor
RARE	retinoic acid response element
RoDH	retinol dehydrogenase
RBP	retinol-binding protein
RE	retinyl esters
REH	retinyl ester hydrolase
RXR	retinoid X receptor
RXRE	retinoid X response element
T₃R	thyroid hormone receptor
TTR	transthyretin
VDR	vitamin D receptor

"Le plaisir de la table est de tous les âges,
de toutes les conditions, de tous les pays et de tous les jours;
il peut s'associer à tous les autres plaisirs,
et reste le dernier pour nous consoler de leur perte."

Brillat-Savarin, Physiologie du Goût (1954)

CHAPITRE 1. INTRODUCTION: REVUE DE LA LITTERATURE

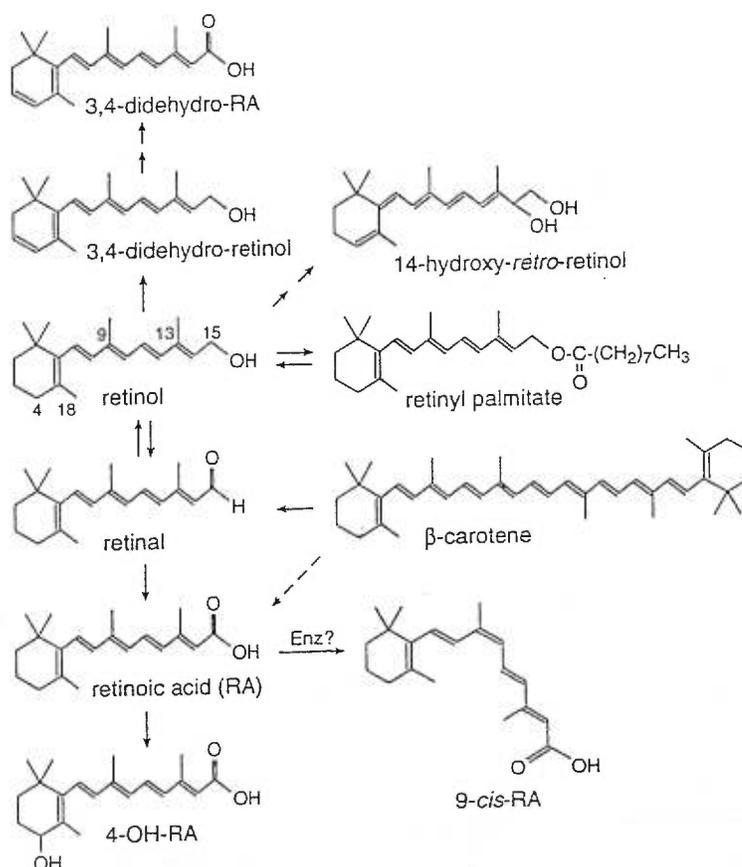
1. Fonctions et métabolisme de la vitamine A

1.1 Définition et structure

Le terme générique de vitamine A englobe les rétinoïdes naturels ou synthétiques possédant une activité biologique vitaminique A ainsi que les caroténoïdes pouvant être transformés en rétinoïdes. Les rétinoïdes naturels sont composés de quatre unités isoprènes joints bout-à-bout et disposés de sorte à former un noyau cyclohexène et une chaîne latérale isoprène sur laquelle est attaché un groupement plus ou moins polaire (Dawson et Hobbs 1994). Les rétinoïdes peuvent se retrouver sous la forme alcool (le rétinol), qui est la forme circulante dans l'organisme; ester (le palmitate de rétinol), la forme de mise en réserve; aldéhyde (le rétinal), un intermédiaire actif dans la vision et acide (l'acide rétinoïque), considéré comme le métabolite actif de la vitamine (voir la figure 1). Si les rétinoïdes se retrouvent surtout sous la forme *trans*, quelques isomères *cis* ont aussi une activité vitaminique A. Certains dérivés synthétiques, tels que l'étrétinate et le *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide utilisés comme agents thérapeutiques en dermatologie et en cancérologie, respectivement, font aussi partie de cette appellation vitamine A (Olson 1991).

Des quelques six cents caroténoïdes retrouvés dans la nature, seulement une cinquantaine d'entre eux sont convertis en rétinoïdes dans l'organisme et exercent ainsi une fonction provitaminique A. En revanche, la plupart des caroténoïdes ont une capacité anti-oxydante distincte de l'activité biologique A. Le β -carotène représente le plus abondant et le plus étudié des caroténoïdes (Olson 1991). Pour les fins de cet exposé, l'accent sera mis principalement sur les rétinoïdes, puisque dans nos conditions expérimentales, les caroténoïdes n'ont pas contribué au métabolisme de la vitamine A.

Figure 1. Structure de la vitamine A



(tiré de Napoli 1996)

1.2 Fonctions

De toute la diversité de fonctions biologiques requérant la vitamine A, son implication dans la vision est sans doute celle la plus anciennement reconnue et la mieux définie. Au temps de l'antiquité égyptienne, on soignait la cécité à l'obscurité et certaines maladies oculaires par l'application topique d'un extrait de foie ou par la consommation de foie (*Hicks 1867, Olson 1991*). L'élément actif du foie, la vitamine A, fut identifié en 1914, comme essentiel à la croissance des rats et sa structure moléculaire fut publiée en 1930 (*Moore 1957*). Le métabolite actif de la vitamine A impliqué dans la vision est le 11-*cis*-rétinal, lequel se lie à la protéine opsine pour

former la rhodopsine. Sous l'effet d'une exposition à la lumière, la rhodopsine est isomérisée en un intermédiaire qui engendre une cascade de réactions impliquant une protéine G (la transducine) menant à l'ouverture des canaux sodiques du segment externe des bâtonnets provoquant une hyperpolarisation de la membrane. Ce changement du potentiel de membrane est ensuite retransmis au cerveau où le message est intégré (*Saari 1994*).

La vitamine A est essentielle à bon nombre de fonctions vitales incluant la spermatogénèse, l'embryogénèse, l'hématopoïèse et le développement. Elle est aussi impliquée dans certains processus biologiques tels que la réponse immune, la carcinogénèse, la formation osseuse, le renouvellement des tissus épithéliaux, le goût, l'ouïe et l'appétit (*Olson 1991, Mangelsdorf 1994*). Le rôle régulateur qu'exerce la vitamine dans la différenciation cellulaire semble expliquer l'ensemble de ces fonctions. La modulation de l'expression des gènes par la vitamine A est depuis longtemps soupçonnée, mais n'a été élucidée que depuis une dizaine d'années, lors de la découverte de récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque (RAR et RXR) (*Giguère et al. 1987, Petkovitch et al. 1987*). Différents récepteurs ont été identifiés à ce jour et au moins un d'entre eux est exprimé dans les cellules répondant à l'acide rétinoïque. Ces récepteurs nucléaires font partie d'une superfamille incluant les récepteurs aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, à la vitamine D et aux agents inducteurs de la prolifération des péroxisomes (PPAR). Les récepteurs RAR et RXR, lorsqu'activés par la liaison avec l'acide rétinoïque se lient à un élément de réponse situé en amont du gène et modulent sa transcription par des mécanismes faisant actuellement l'objet d'une intense recherche (*Chambon 1996*).

1.3 Absorption intestinale

De nature liposoluble, la vitamine A suit la voie d'absorption générale des lipides tout en faisant intervenir des mécanismes qui lui sont propres (voir la figure 2). L'ensemble de la vitamine A requis par l'organisme provient de la diète qui fournit la

vitamine sous deux formes, soient les caroténoïdes et les rétinoïdes. Les rétinoïdes se retrouvent dans les aliments d'origine animale, surtout sous forme d'esters de rétinol, puisqu'il s'agit de la forme d'entreposage. Les caroténoïdes, synthétisés par les plantes, constituent les précurseurs de cette vitamine. La diète n'apporte que d'infimes quantités d'acide rétinoïque. Les caroténoïdes alimentaires sont absorbés tels quels dans la muqueuse intestinale, alors que les rétinoïdes sont absorbés sous forme de rétinol suite à une hydrolyse intra-luminale des esters de rétinol.

1.3.1 Hydrolyse intra-luminale

Sous l'action combinée des sels biliaires et du péristaltisme intestinal, les esters de rétinol sont dispersés dans les micelles, particules polaires de petite taille permettant une grande surface de contact avec les enzymes lipolytiques. L'hydrolyse des esters de rétinol constitue une étape nécessaire à l'absorption du rétinol. Deux enzymes pancréatiques, la lipase pancréatique non-spécifique et la cholestéryl ester hydrolase (CEH) étaient généralement reconnues comme responsables de l'hydrolyse des esters de rétinol, tout comme ceux du cholestérol (*Harrison 1993*). Cependant, la présence d'une autre enzyme, distincte des premières et intrinsèque à la bordure en brosse de l'intestin, a été démontrée (*Rigtrup et Ong 1992*). Cette enzyme montre une activité retinyl ester hydrolase (REH) préférentiellement pour les acides gras à chaînes longues, typiquement retrouvés dans la diète, tels que le palmitate et stéarate, alors que les lipases originaires du pancréas s'attaqueraient surtout aux acides gras à chaînes courtes de moins de 10 carbones (*Ong 1993*). La REH intestinale a maintenant été purifiée et ses propriétés cinétiques sont déterminées: elle possède un poids moléculaire d'environ 130 000 Da, se situe dans les deux tiers distaux de l'intestin grêle, présente une puissante activité phospholipase et réagit à un anticorps polyclonal dirigé contre la phospholipase B, suggérant la même structure. Son activité catalytique pour le rétinyl palmitate est fortement stimulée par des sels biliaires non-conjugués alors que les sels biliaires tauro-conjugués activent surtout l'activité de phospholipase (*Rigtrup et al. 1994a*). Selon les propriétés cinétiques de la REH intestinale, il a été calculé que son

activité serait suffisante à hydrolyser, en moins de deux minutes, la quantité d'esters de rétinol nécessaires à rencontrer les besoins nutritionnels quotidiens d'un rat en période de croissance (*Rigtrup et Ong 1992*). Finalement, ces caractéristiques de la REH intestinale démontrées chez le rat ont été retrouvées dans des membranes isolées de bordure en brosse de l'intestin humain, faisant du rat un bon modèle pour étudier l'absorption du rétinol (*Rigtrup et al. 1994b*).

1.3.2 Captage du rétinol par les entérocytes

Le rétinol résultant de l'hydrolyse intra-luminale des esters de rétinol est absorbé dans les entérocytes par diffusion facilitée, c'est-à-dire via un transporteur protéique, lorsque le rétinol est présent en concentrations physiologiques. Lorsque testé avec différentes formes de rétinoïdes, le transporteur démontre une spécificité pour la forme alcool (rétinol). De plus, la spécificité du transporteur ne semble pas dépendre de l'affinité des différents rétinoïdes pour la protéine de transport intra-cellulaire «cellular retinol-binding protein type II» (CRPB II), protéine spécifique chargée du transport et du métabolisme du rétinol dans l'entérocyte, ni de leur métabolisme subséquent, notamment, l'estérification du rétinol (*Dew et Ong 1994*). Il est estimé qu'un minimum de 50% de la vitamine A ingérée est absorbée, chez le rat et l'humain, bien qu'aucune relation dépendante de la dose n'ait été établie (*Blomhoff et al. 1991*). On sait toutefois que le rétinol, en concentrations pharmacologiques dans la lumière intestinale, est alors absorbé par diffusion passive.

Par opposition au rétinol, l'absorption des caroténoïdes est beaucoup plus faible (moins de 50% des caroténoïdes ingérés, chez l'humain) et tributaire de la présence de lipides (*Roels et al. 1958*). Quoiqu'elle se fasse par diffusion passive, l'absorption des caroténoïdes diminue de façon marquée en présence de fortes doses et serait ainsi probablement limitée par la dégradation incomplète des parois cellulaires végétales dans la lumière intestinale (*Blomhoff 1991*). Dans l'entérocyte, une large part des caroténoïdes possédant une activité biologique de vitamine A (une cinquantaine sur

environ 600 caroténoïdes retrouvés dans la nature) est convertie en rétinol (*Goodman et al. 1966*). Deux voies enzymatiques pour la conversion en rétinol sont aujourd'hui décrites chez les mammifères. Dans la première, les caroténoïdes subissent un clivage central par la β -caroténoïd-15,15'-dioxygénase, les transformant théoriquement en deux molécules de rétinol, lesquelles sont ensuite réduites en rétinol (*Olson 1989*). La seconde voie implique un clivage excentrique des caroténoïdes produisant des β -apocaroténals, du rétinol et de l'acide rétinoïque. À l'aide d'homogénats d'intestin humain, il a été démontré que le β -carotène pouvait directement être transformé en acide rétinoïque en présence de citral, un inhibiteur de la conversion du rétinol en acide rétinoïque (*Wang et al. 1992*). Toutefois, les enzymes impliquées dans cette dernière voie ne sont pas encore identifiées.

1.3.3. Estérification du rétinol et incorporation dans les chylomicrons

Dans l'entérocyte, les molécules de rétinol sont acheminées de la membrane plasmique au réticulum endoplasmique pour y subir une estérification et une incorporation dans les chylomicrons, les véhicules de la vitamine A nouvellement absorbée. Une protéine intracellulaire spécifique (CRBP II) remplit des fonctions importantes dans la régulation de ces événements. Cette protéine, membre de la famille des protéines liant les acides gras (fatty acid binding proteins), possède un site de liaison pour le rétinol et une affinité semblable pour le rétinol. Elle se retrouve en abondance dans la muqueuse intestinale, représentant environ 0.4% et 1% des protéines cytosoliques chez l'humain et le rat, respectivement (*Ong 1993*). Bien qu'on puisse détecter la présence de CRBP II dans le foie de rats nouveaux-nés, elle est exclusivement retrouvée dans la muqueuse intestinale des animaux adultes, autant dans la région basale qu'apicale de l'entérocyte (*Crow et Ong 1985*). La CRBP II se charge non seulement de diriger le rétinol vers les enzymes impliquées dans sa transformation, mais agit également comme substrat pour ces enzymes. Lorsque lié à la CRBP II, le rétinol résultant du clivage des caroténoïdes est rapidement réduit en rétinol par une réductase microsomale. Si la transformation du rétinol en rétinol est réversible, la

liaison du rétinol avec la CRBP II favorise grandement la voie de la réduction, l'étape physiologique requise, plutôt que la voie oxydative (*Ong 1993*).

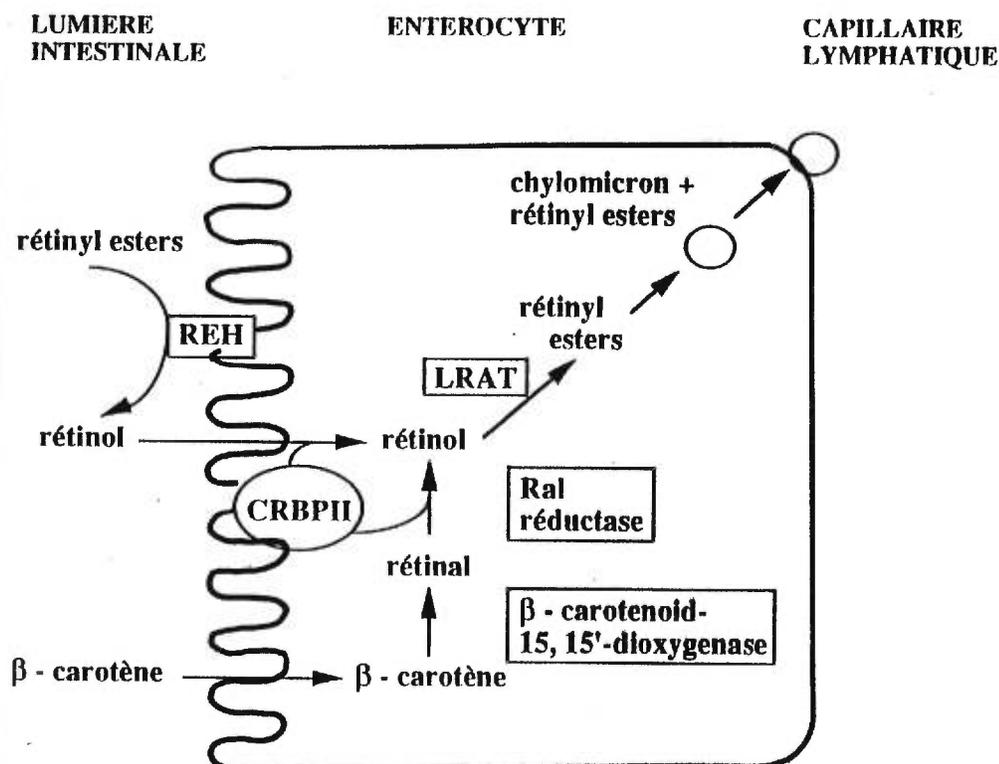
On a longtemps cru que les enzymes estérifiant le cholestérol étaient aussi responsables de l'estérification du rétinol, mais il est maintenant reconnu que cette dernière implique des enzymes spécifiques: l'ARAT, «acylCoA:retinol acyltransferase», et la LRAT, «lecithin: retinol acyltransférase». Le rétinol libre peut être estérifié par l'une ou l'autre de ces enzymes. Par contre, la LRAT montre une activité spécifique pour le rétinol lié à la CRBP II, telle que démontrée par l'inhibition compétitive par l'apo-CRBP, tandis que ce substrat n'est pas utilisé par l'ARAT. La LRAT utilise pour donneur endogène d'acide gras, la phosphatidylcholine (lécithine) et montre une sélectivité pour l'acide gras placé en position *sn*-1 (*Ong 1993*). Selon l'hypothèse proposée par Yost *et al.* (1988), la LRAT serait l'enzyme prédominante pour l'estérification de quantités physiologiques de rétinol absorbé alors que l'ARAT serait recrutée lorsque des quantités supraphysiologiques de rétinol sont absorbées. L'activité de cette dernière enzyme augmente d'ailleurs lors d'ingestion de larges doses de rétinol. Plus de 80% du rétinol est estérifié avec des acides gras à chaînes longues, principalement les acides palmitique et stéarique, et en moindres proportions, les acides oléique et linoléique et ce, indépendamment des types d'acides gras présents dans la diète (*Blomhoff et al. 1991*).

De nombreux facteurs peuvent influencer l'absorption du rétinol et ce, à l'une ou l'autre des étapes mentionnées. Dans un premier temps, la micellinisation du rétinol dépend de la présence d'acides biliaires dans la lumière intestinale. Les lipides alimentaires sont également requis pour la solubilisation du rétinol et de façon encore plus importante pour les caroténoïdes. Toutefois, le type de lipides n'exerce pas la même influence sur l'absorption du rétinol. Ainsi, les acides gras à chaînes courtes et moyennes l'augmentent tandis que les acides gras polyinsaturés à chaînes longues la diminuent, tel que démontré chez le rat *in vivo* (*Hollander 1981*). De plus, un pH légèrement acide favoriserait l'absorption du rétinol.

Dans un deuxième temps, l'état nutritionnel ou les besoins en rétinol influencent son absorption via des effets sur la CRBP II et les enzymes impliquées dans l'estérification. Effectivement, les quantités de CRBP II et de son ARNm sont augmentées chez des rats femelles allaitant et en gestation (*Blomhoff et al. 1991*) de même que chez des rats déficients en rétinoïdes (*Rajan et al. 1990*). Puisque le rétinol lié à la CRBP II représente le substrat de la LRAT, la disponibilité de la protéine et sa saturation par le rétinol constitue un facteur limitant dans l'estérification du rétinol par cette voie. L'activité de l'ARAT augmente avec l'apport en rétinol, ce qui appuie l'hypothèse voulant que cette enzyme estérifie le rétinol lorsqu'ingéré en grandes quantités, c'est-à-dire, lorsque la CRBP II et la LRAT deviennent saturées.

Figure 2. Absorption intestinale

Dans la lumière intestinale, les rétinyl esters ingérés sont hydrolysés en rétinol par une REH spécifique, localisée dans la bordure en brosse. Une fois entré dans l'entérocyte, grâce à un transporteur protéique, le rétinol se lie à une protéine de transport intra-cellulaire, la CRBPII. Cette protéine peut aussi lier le rétinol résultant du clivage des caroténoïdes. La CRBPII dirige le rétinol vers la rétinol réductase afin de former du rétinol et dirige le rétinol vers la LRAT pour synthétiser de nouveaux esters. Ces rétinyl esters sont ensuite incorporés dans les chylomicrons et relâchés dans la voie lymphatique.



1.3.4 Transport lymphatique

Dans l'entérocyte, les esters de rétinol sont incorporés dans les chylomicrons, de pair avec les triglycérides, le cholestérol estérifié et libre, les phospholipides, les apoprotéines et les autres vitamines liposolubles. Ces chylomicrons dits "naissants" passent par la circulation lymphatique mésentérique, puis thoracique, pour rejoindre la circulation sanguine périphérique où ils sont convertis en "résidus" de chylomicrons, suite à l'hydrolyse partielle des triglycérides par la lipoprotéine lipase. Les résidus de chylomicrons sont majoritairement captés par le foie (environ 70%), grâce à la reconnaissance préférentielle de l'apoprotéine E par des récepteurs spécifiques de haute affinité (*Blomhoff et al. 1991*). Des tissus extra-hépatiques tels que le tissu adipeux, le muscle squelettique et le rein, peuvent aussi capter une part des résidus de chylomicrons, chez le rat (*Goodman et al. 1965*). Plus récemment, Hussain *et al.* (1989) ont démontré, chez les lapins et les primates, que la moelle osseuse exerce un rôle important dans le retrait des chylomicrons de la circulation de même que la rate, chez les rats, les cobayes et les chiens. Ainsi, les chylomicrons pourraient représenter un important véhicule de transport des esters de rétinol vers des tissus où la prolifération et la différenciation cellulaire sont très actives, comme la moelle osseuse et la rate.

En conditions normales, presque toute la vitamine A absorbée est transportée par les chylomicrons via la voie lymphatique jusqu'à la circulation systémique. Mais une petite quantité de rétinol est aussi transportée via la circulation portale, qui constitue par ailleurs, la voie d'absorption de l'acide rétinoïque (*Smith et al. 1973*).

1.4 Métabolisme hépatique

Le foie constitue le principal site de réserve des rétinoïdes, entreposant près de 90% de la totalité de l'organisme, chez les mammifères dont l'état nutritionnel en vitamine A est adéquat (*Moore 1957, Raica et al. 1972*). Bon nombre de tissus extra-hépatiques

entreposent le reste des rétinoïdes et l'importance relative de ceux-ci par rapport au foie augmente chez les animaux déficients en vitamine A (*Green et al. 1985*). Des divers types cellulaires du foie, les hépatocytes et les cellules non-parenchymales périsinusoïdales étoilées exercent des rôles prépondérants et distincts dans le métabolisme des rétinoïdes. On attribue aux hépatocytes les fonctions de captage des résidus de chylomicrons ainsi que la synthèse et la sécrétion de la protéine liant le rétinol, la «retinol-binding protein» (RBP), alors que les cellules étoilées sont surtout reconnues pour entreposer les rétinoïdes (*Hendriks et al. 1985, Blaner et al. 1985, Blomhoff et al. 1985*). Des réactions inverses d'hydrolyse et d'estérification permettent de convertir les esters de rétinol en rétinol, la forme circulante de la vitamine, et le rétinol en esters de rétinol, la forme de mise en réserve (voir la figure 3).

1.4.1 Hydrolyse des esters de rétinol

L'hydrolyse des esters de rétinol hépatiques survient à deux étapes du métabolisme: au moment de l'arrivée des esters de rétinol nouvellement absorbés et lors de la mobilisation du rétinol vers la circulation. Plusieurs enzymes possédant cette activité REH ont été décrites et peuvent être divisées en deux grandes catégories, selon qu'elles soient dépendantes ou non de la présence de sels biliaires (*Harrison 1993*). Une enzyme de la première catégorie, initialement décrite par Mahadevan *et al.* (1966) chez le rat, dépend des sels biliaires et démontre une grande variabilité individuelle ainsi qu'une distribution sub-cellulaire bien particulière, son activité étant répartie entre les fractions nucléaires et le cytosol et très peu associée à la fraction microsomale. La présence de cette activité a pu être décelée dans les hépatocytes et les cellules étoilées (*Blaner et al. 1985a*). Quoiqu'ayant une activité spécifique inférieure, cette REH présente de nombreuses similarités avec la CEH pancréatique et son activité se voit complètement inhibée par des IgG spécifiques dirigés contre l'hydrolase pancréatique (*Harrison et Gad 1989*). D'autres activités REH dépendantes des acides biliaires et agissant à pH neutre ont été décrites et partiellement caractérisées chez le porc (*Cooper et Olson 1986*), le rat (*Cooper et al. 1987*) et l'humain (*Mourey et Amédée-Manesme*

1992). Celles-ci sont mesurées dans l'homogénat total de foie et se distinguent par le fait qu'elles requièrent la présence de détergents en concentration supraphysiologique.

Etudiée plus récemment, la deuxième enzyme ne requiert pas la présence de sels biliaires et agit à pH neutre. Son activité n'est pas inhibée par des anticorps anti-CEH pancréatique, varie beaucoup moins entre les individus et se localise surtout dans la fraction microsomale du foie ainsi que dans la membrane plasmique (*Harrison et Gad 1989*). Cette localisation permettrait que l'enzyme soit impliquée dans l'hydrolyse initiale des esters de rétinol provenant des chylomicrons. L'importance physiologique et la spécificité de cette enzyme sont appuyées par la stimulation de son activité en présence de quantités physiologiques d'apo-CRBP, de façon saturable et dépendante de la concentration (*Boerman et Napoli 1991*). En plus du foie, l'hydrolyse des esters de rétinol endogènes stimulée par l'apo-CRBP a été rapportée dans les reins, les poumons et les testicules de rat (*Napoli et al. 1989*). L'apo-CRBP agirait vraisemblablement comme protéine de régulation de l'hydrolyse des esters de rétinol et de la mobilisation du rétinol de plusieurs tissus. Une autre REH ressemble à tous points de vue à la dernière enzyme mentionnée, mais agit plutôt à pH acide (*Gad et Harrison 1991*).

Finalement, *Mercier et al. (1994)* ont récemment identifié une nouvelle REH agissant à pH acide dont l'activité se concentre dans la fraction lysosomale du foie. In vitro, la REH acide peut hydrolyser les esters de rétinol contenus dans les gouttelettes lipidiques des cellules étoilées et son activité spécifique serait supérieure dans ces cellules que dans les hépatocytes (*Azais-Braesco et al. 1995*). A partir de ces observations et étant donné la proximité des lysosomes et des gouttelettes lipidiques, telle que démontrée par microscopie électronique (*Enzan et al. 1991*), il a été postulé que la REH acide serait responsable de l'hydrolyse des esters de rétinol mis en réserve, pour la mobilisation du rétinol en circulation. De toute évidence, plusieurs activités REH existent parallèlement dans le foie mais leurs fonctions et leurs régulations spécifiques restent à être élucidées.

1.4.2 Transfert du rétinol de l'hépatocyte à la cellule étoilée

Bien que les hépatocytes soient responsables de capter les rétinoïdes provenant de la diète, les cellules étoilées contiennent la majorité des rétinoïdes du foie. Ceci suggère donc un transfert du rétinol, de l'hépatocyte à ces cellules (voir figure 3).

Suite à l'action REH dans l'hépatocyte, le rétinol est transféré au réticulum endoplasmique où il se lie à la RBP (holo-RBP). Cette liaison altère vraisemblablement la conformation de la protéine, initiant une translocation du rétinol-RBP du réticulum endoplasmique au Golgi, suivie d'une sécrétion du complexe protéique hors de la cellule (*Ronne et al. 1983*). A cause de la rapidité du transfert de l'hépatocyte à la cellule étoilée, démontrée par le suivi de [³H]rétinol, *Blomhoff et al. (1984)* ont suggéré que ce transfert ne requiert pas une sécrétion du rétinol dans le sang mais a lieu directement de cellule à cellule *in vivo*. A ce jour, deux hypothèses majeures ont été proposées quant au mécanisme de transfert du rétinol de l'hépatocyte à la cellule étoilée et suggèrent toutes deux un transfert médié par la RBP. Plusieurs observations appuient cette vue: il a été démontré que les cellules étoilées peuvent capter séparément le rétinol (*Blomhoff et al. 1985*) et la RBP (*Gjoen et al. 1987*) du complexe rétinol-RBP et d'autre part, que les hépatocytes mis en culture sécrètent ce complexe (*Blaner 1989*). De plus, des anticorps dirigés contre la RBP inhibent le transfert paracrine du rétinol de l'hépatocyte à la cellule étoilée (*Blomhoff et al. 1988*). Les chercheurs ne sont pas unanimes quant à l'internalisation de la RBP par les cellules étoilées. Appuyant l'hypothèse de l'internalisation de la RBP, la protéine ainsi que son ARN messager ont pu être détectés par certains chercheurs dans les cellules étoilées isolées et mises en culture, ces dernières pouvant aussi sécréter le complexe rétinol-RBP, processus favorisé par la présence d'apo-RBP dans le milieu (*Anderson et al. 1992*). Cependant, d'autres équipes de chercheurs n'ont pu identifier ni la RBP ni son ARN messager dans les cellules étoilées, que ce soit par des méthodes biochimiques (*Blaner et al. 1985a, Yamada et al. 1987*) ou par microscopie électronique (*Kato et al. 1984, Suhara et al. 1990*). Les tenants de la seconde hypothèse proposent donc une dissociation du rétinol-

RBP suite à son relâchement dans l'espace interstitiel, et l'entrée du rétinol libre dans la cellule étoilée par diffusion dans la membrane suivie d'une liaison à l'apo-CRBP, présente en importante quantité dans ces cellules (*Noy et Xu 1990, Blaner et al. 1985a*).

Le transfert à la cellule étoilée semble spécifique au rétinol. En effet, même si le cholestérol et la vitamine D₃ sont captés avec les esters de rétinol par les cellules parenchymateuses, ces nutriments ne sont pas transférés aux cellules étoilées (*Blomhoff et al. 1991*). Toutefois, les vitamines E et K ont été détectées dans les gouttelettes lipidiques des cellules étoilées (*Brouwer et al. 1988*). De plus, le statut en vitamine A semble influencer le transfert du rétinol à la cellule étoilée. Les mécanismes décrits ci-haut surviennent chez des animaux ayant certaines réserves de vitamine A. Chez des rats déficients en vitamine A, très peu ou pas de rétinol provenant des résidus de chylomicrons n'est transféré aux cellules étoilées (*Blomhoff et al. 1991*).

1.4.3 Estérification et mise en réserve

Les rétinoïdes sont entreposés dans les gouttelettes lipidiques des cellules étoilées. En séparant les différentes cellules hépatiques, on a pu constater que les cellules étoilées contiennent de 28 à 34 nmol de rétinol par million de cellules alors que les cellules parenchymateuses en contiennent 0.5 à 0.8 nmol par million de cellules (*Blomhoff et al. 1985*). Des quantités négligeables se trouvent dans les cellules de Kupffer et endothéliales. En fait, 80-90% des rétinoïdes totaux du foie se retrouvent dans les cellules étoilées, dans des conditions où les réserves sont limitées, normales ou excessives. Les hépatocytes et les cellules étoilées contiennent aussi la CRBP I; cependant, lorsqu'exprimée par mg de protéine, la CRBP est concentrée dans la cellule étoilée qui en contient 22 fois plus que l'hépatocyte (*Yamada et al. 1987, Blaner et al. 1985a*). Dans les cas d'extrême déficience, la proportion de rétinoïdes entreposés diminue dans les cellules étoilées et augmente dans les cellules parenchymateuses (*Batres and Olson 1987*). Des expériences menées chez des rats déficients en vitamine A ont montré que le captage des rétinoïdes par les hépatocytes et par les cellules étoilées

est de beaucoup réduit chez ces animaux (*Ramadori 1991*). Cette observation a alors été expliquée par une concentration faible de ces cellules en CRBP, toutefois, des expériences ultérieures ont infirmé cette hypothèse. *Rajan et al. (1990)* ont en effet démontré que ni les taux de CRBP ni les taux d'ARNm de CRBP hépatiques n'étaient influencés par la déficience en rétinoïdes. Ces différences pourraient être attribuables à des degrés variables de la déficience en rétinoïdes ou à une régulation de l'expression de la CRBP selon le type cellulaire. Ce point sera traité plus en détails à la section 1.6.3.

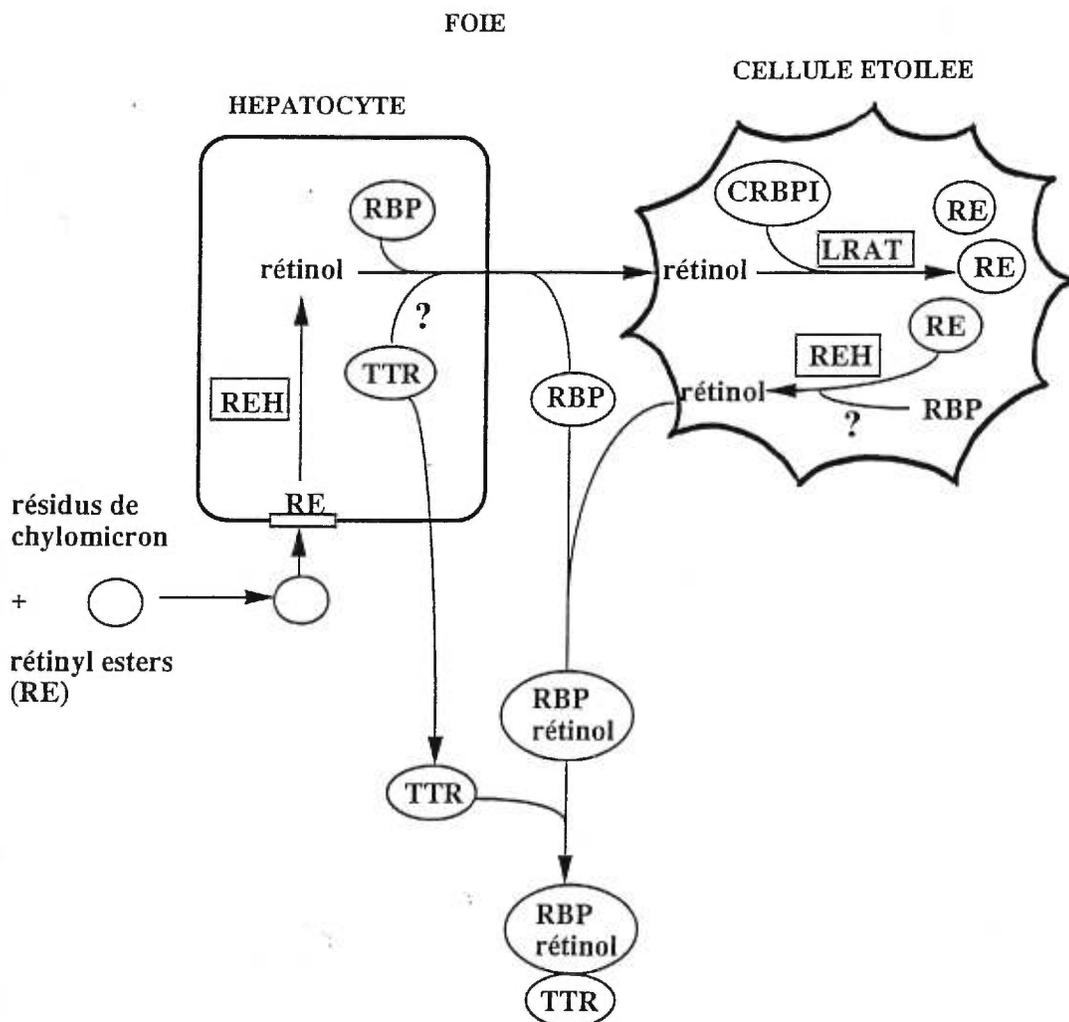
A son arrivée à la cellule étoilée, le rétinol est estérifié par les mêmes enzymes qui sont responsables de son estérification dans l'entérocyte, c'est-à-dire, l'ARAT et la LRAT. Pareillement à son rôle décrit dans l'entérocyte, la CRBP dirigerait le rétinol vers la LRAT lorsque l'apport en vitamine A est normal, alors que l'ARAT serait chargée de l'estérification de l'excédent lors d'apports excessifs (*Yost et al. 1988, Randolph et al. 1991*). L'activité de la LRAT se concentre dans la fraction microsomale des hépatocytes et des cellules étoilées, ces dernières ayant une activité spécifique supérieure (*Blaner et al. 1990*). La LRAT utilise préférentiellement le rétinol lié à la CRBP comme substrat et son activité se voit inhibée de façon compétitive par l'apo-CRBP (*Herr et Ong 1992*). Chez des souris transgéniques qui surexpriment la CRBP dans plusieurs tissus, *Trøen et al. (1996)* n'ont pourtant pas observé des réserves de rétinyl esters supérieures à celles des souris normales. Il faut toutefois remarquer que puisque les taux de rétinol tissulaires sont demeurés les mêmes, il est à supposer que la proportion d'apo-CRBP était augmentée. Ainsi, l'activité de la LRAT a pu être inhibée ou maintenue, dépendamment du ratio apo-CRBP/holo-CRBP.

Par ailleurs, il a été récemment démontré que les cellules non-parenchymateuses présentaient une activité spécifique LRAT de 10 fois supérieure à celle des hépatocytes (*Matsuura et al. 1997*). L'activité de la LRAT hépatique est fortement modulée par l'état nutritionnel en vitamine A, celle-ci étant pratiquement indétectable dans la déficience en rétinoïdes, tandis que les activités de l'ARAT hépatique et de la LRAT

intestinale ne sont pas affectées (*Randolph et Ross 1991*). Par surcroît, l'activité de la LRAT est restaurée suite à une réplétion en rétinol ou en acide rétinoïque (*Ross 1993*), ce dernier étant plus efficace que le rétinol en quantités équimolaires (*Matsuura et Ross 1993*).

Figure 3. Métabolisme hépatique et mobilisation des rétinoïdes

Les rétinyl esters contenus dans les chylomicrons intègrent l'hépatocyte, via le récepteur de l'apo E, pour y subir une hydrolyse par une REH qui n'est pas clairement définie. Le rétinol résultant est alors transféré à la cellule étoilée, probablement lié à la RBP, pour y être réestérifié et ainsi, mis en réserve. L'enzyme LRAT est responsable de l'estérification du rétinol lié à la CRBPI. Le rétinol peut être mis en circulation sanguine directement de l'hépatocyte et vraisemblablement aussi de la cellule étoilée. Dans le premier cas, le rétinol se lie à la RBP (protéine de transport sanguin) dans l'hépatocyte et est ainsi relâché en circulation. Il est suggéré que la TTR se joindrait au rétinol-RBP à l'intérieur de l'hépatocyte plutôt que dans la voie sanguine, afin de former le complexe de transport. De la cellule étoilée, le rétinol résultant de l'hydrolyse des esters par une REH, se lierait à la RBP dans l'interstice, quoiqu'un groupe de chercheurs ayant détecté la présence de RBP dans les cellules étoilées propose que la liaison ait lieu à l'intérieur de la cellule.



1.4.4. Mobilisation des rétinoïdes

La vitamine A est mise en circulation liée à sa protéine spécifique de transport, la RBP (voir la figure 3). Les esters de rétinol entreposés dans les cellules étoilées doivent subir une hydrolyse, puisque la RBP lie avec une affinité supérieure, le rétinol. Ces cellules et les hépatocytes possèdent une activité REH tandis qu'essentiellement aucune activité n'est retrouvée dans les cellules de Kupffer et endothéliales. La REH indépendante des acides biliaires représente la candidate la plus plausible pour remplir ce rôle, tel que précédemment décrit au point 1.3.1.

Le site exact et le mécanisme de la relâche du rétinol en circulation ne sont pas encore connus et ceci, à cause de la controverse actuelle concernant la synthèse et la présence de RBP dans les cellules étoilées. Les hépatocytes contiennent de 70-110 ng RBP/mg protéine et comme ces cellules représentent la grande part de la masse hépatique, on y retrouve plus de 90% de la RBP hépatique. Mais l'équipe de Blomhoff *et al.* (1988) a pu détecter de faibles quantités de RBP dans les cellules étoilées, à raison de 25-168 ng RBP/mg protéine. Ces chercheurs postulent que la faible quantité de RBP détectée dans les cellules étoilées pourrait provenir de l'endocytose et/ou de la synthèse endogène de RBP. En effet, ils ont plus récemment mis en évidence des quantités appréciables d'ARNm pour la RBP, dans des cellules étoilées mises en culture (Anderson 1992). Cette même étude a de plus montré que des cellules étoilées cultivées dans un milieu sans sérum pouvaient sécréter le complexe rétinol-RBP et que des inhibiteurs de la sécrétion protéique inhibaient justement cette sécrétion. Finalement, l'étude rapporte l'expression d'ARNm pour la RBP par les cellules étoilées du poumon, soutenant ainsi l'hypothèse d'une mobilisation du rétinol-RBP d'autres organes que le foie. Ces dernières observations appuient donc la suggestion que le rétinol-RBP puisse être mobilisé directement des cellules étoilées à la circulation sanguine sans devoir préalablement passer par les hépatocytes.

Cependant, plusieurs autres chercheurs n'ont pu identifier la présence de RBP en quantité appréciable dans des préparations de cellules étoilées hautement purifiées et ce, soit par immunohistochimie (*Kato et al. 1984*), par radio-immunoétalonnage (RIA) (*Blaner et al. 1985a, Yamada et al. 1987, Moriwaki et al. 1988*) ou par immunolocalisation en microscopie électronique (*Suhara et al. 1990*). De plus, l'ARNm de RBP n'a pu être détectée dans des cellules étoilées purifiées (*Yamada et al. 1987, Friedman et al. 1992*). Il semble que ces observations contrastées puissent provenir de modifications métaboliques inhérentes à la mise en culture des cellules étoilées, mais elles demeurent inexplicables à ce jour. Effectivement, lors de sa mise en culture, la cellule étoilée change rapidement de phénotype tout en perdant son contenu en rétinoïdes et se différencie en myofibroblaste (*Ramadori 1991*).

1.5 Transport plasmatique

Le rétinol représente la principale forme sous laquelle la vitamine A est véhiculée dans la circulation systémique. Les taux sanguins de rétinol font l'objet d'une homéostasie bien contrôlée, bien qu'on n'en connaisse pas encore tous les mécanismes régulateurs. Alors que l'acide rétinoïque, présent dans le sang en concentrations cent fois inférieures à celles du rétinol, est véhiculé par l'albumine (*Lehman et al. 1972, Smith et al. 1973*), le transport sanguin du rétinol est exclusivement assuré par sa protéine de transport spécifique, la RBP (*Soprano et Blaner 1994*).

1.5.1 Protéine de transport plasmatique (RBP)

La RBP, isolée par *Kanai et al. (1968)*, est formée d'une seule chaîne polypeptidique possédant un site de liaison pour une molécule de rétinol. Cette protéine de faible poids moléculaire (21 422 Da) circule liée à une autre protéine plasmatique, la transthyréline (TTR, anciennement nommée préalbumine), dans un ratio molaire de 1:1 (voir la figure 3). Il est suggéré que la formation de ce complexe a pour but d'empêcher la filtration glomérulaire et de réduire le catabolisme rénal de la RBP. Comme plus de 90-95 % de

la RBP est liée au rétinol (holo-RBP), ses taux sanguins sont aussi bien contrôlés, variant peu entre les individus, hormis dans des cas extrêmes de déficience en vitamine A ou de certaines pathologies. Chez l'humain, ils sont de l'ordre de 40 à 60 $\mu\text{g/mL}$ (2-3 μM).

1.5.1.1. Structure

La structure primaire de la RBP humaine fut mise en évidence en 1979, par Rask *et al.*: la séquence comporte 182 acides aminés et 3 ponts disulfure. Les RBP de lapin, de bovin, de poisson et de rat ont aussi été séquencées, cette dernière comportant 183 acides aminés, et toutes possèdent une forte homologie avec la RBP humaine (*Sundelin et al. 1985, Berni et al. 1990, 1991*). Grâce à la technique de cristallographie à rayons X, la structure tridimensionnelle de la RBP humaine a pu être visualisée. Constituée de divers motifs, elle forme une protéine globulaire de 40 Å de diamètre (*Newcomer et al. 1984, Ottonello et al. 1983*). La molécule de rétinol s'insère dans un motif β , au centre de la protéine, et il est postulé que le retrait du rétinol entraîne un changement conformationnel de la RBP (*Sandblom et al. 1986*). De par sa structure tertiaire, la RBP s'apparente à plusieurs autres protéines liant de petites molécules hydrophobes, telles que la β -lactoglobuline, l'apoprotéine D, l' α_{2u} -globuline, la purpurine, la protéine liant les molécules odorantes ainsi que celle liant la biliverdine (*Soprano et Blaner 1994*).

1.5.1.2 Synthèse hépatique et extra-hépatique

Les gènes codant pour les RBP humaine (*Coluantuoni et al. 1983*) et de rat (*Laurent et al. 1985*) ont été caractérisés et démontrent une organisation très semblable entre ces espèces. Ils sont tous deux composés de 5 introns et 6 exons et couvrent 10 kb et 6.9 kb de l'ADN génomique, pour l'humain et le rat, respectivement. Le foie et plus précisément, les cellules parenchymateuses représentent le principal site de synthèse de la RBP, mais il est maintenant reconnu que plusieurs tissus extra-hépatiques synthétisent

aussi la protéine. Quoique la RBP pouvait être détectée par RIA dans de nombreux tissus, sa synthèse n'a pu être confirmée que depuis l'isolation de son d'ADN complémentaire (cDNA) (*Costanzo et al. 1983, Colantuoni et al. 1983*). On retrouve donc la protéine et son ARNm dans le rein, à des taux représentant 5-10% de ceux du foie, dans les poumons, la rate, le cerveau, le coeur, l'estomac et le muscle squelettique, comptant pour 1-3% de l'expression hépatique (*Soprano et al. 1986*). Plus récemment, la synthèse de RBP a été identifiée dans le tissu adipeux provenant de plusieurs sites anatomiques soient, épидидymal, périnéphrique, inguinal, dorsal, mésentérique, de même que dans le tissu adipeux brun (*Makover et al. 1989, Tsutsumi et al. 1992*). L'expression du gène de la RBP, représentant de 6 à 37% de celle du foie selon le site, confirme que le tissu adipeux est activement impliqué dans le métabolisme des rétinoïdes. Ces observations appuient non seulement l'idée de recyclage du rétinol dans l'organisme, et non pas un aller simple du foie aux tissus extra-hépatiques, mais aussi l'hypothèse du transport inter-cellulaire médié par la RBP.

1.5.1.3 Régulation de la synthèse

A ce jour, les facteurs médiant la sécrétion de la RBP sont mieux identifiés que ceux pouvant affecter l'expression de son gène. En effet, il est bien connu que dans la déficience en vitamine A, l'apo-RBP s'accumule dans le foie alors que les taux de RBP-rétinol plasmatiques diminuent. Dès la réplétion en rétinol, la RBP-rétinol est relâchée de sorte à rétablir les taux circulants (*Soprano et al. 1982*). C'est d'ailleurs sur ce phénomène qu'est basé le test «dose-réponse», utilisé pour estimer l'état nutritionnel en vitamine A. Contrairement à sa sécrétion, la synthèse de RBP ne semble pas contrôlée par l'état vitaminique A, tel que démontré par des taux semblables d'ARNm chez des rats dont les réserves en vitamine A sont adéquates ou épuisées (*Soprano et al. 1986*). Toutefois, *in vitro*, *Mourey et al. (1994)* ont observé une induction du gène de la RBP dans des cellules HepG2 (lignée humaine d'hépatocarcinomes) mises en culture en présence de 10^{-5} M de rétinol et 10^{-6} M d'acide rétinoïque. Bien que ces observations jettent un nouveau regard sur la régulation du gène de la RBP, il est impératif de

souligner que de telles concentrations de rétinol et d'acide rétinoïque libres n'ont jamais été quantifiées, ni dans le plasma, ni dans les tissus, en conditions physiologiques.

Quelques études se sont penchées sur la régulation transcriptionnelle de la RBP. Il a été rapporté que la RBP, tout comme la TTR, fait partie de la classe de protéines de phase aigüe de type négatif, dont la synthèse est inhibée dans des conditions inflammatoires, caractérisées par la libération de cytokines affectant le métabolisme du foie, entres autres tissus (*Schreiber et al. 1989*). Suite à une inflammation induite par injection d'huile de térébenthine chez le rat, ces auteurs ont démontré une diminution des taux d'ARNm de RBP et de TTR, compensée par une induction des protéines de phase aigüe de type positif, résultant en une synthèse protéique hépatique globalement maintenue. *Rosales et al. (1996)* ont associé la diminution des taux de RBP-rétinol plasmatique typiquement observée dans des conditions aigües d'infection et d'inflammation à une réduction des taux hépatiques d'ARNm de RBP. La synthèse de RBP a été rapidement réduite, c'est-à-dire, 12 heures suite à l'injection (i.p.) de lipopolysaccharide (de *Pseudomonas aeruginosa*) induisant une inflammation aigüe. Au niveau du rein, les taux de RBP ont été réduits alors que l'ARNm de RBP n'a pas été affecté par l'inflammation. Les auteurs interprètent ces observations soit par un simple reflet des taux circulants diminués de RBP, soit par une augmentation de sa dégradation tubulaire.

Un ralentissement de la transcription de la RBP hépatique, aussi associée à une baisse des taux plasmatiques, a été trouvée dans une toute autre condition, celle de la nutrition parentérale totale et ce, indépendamment de l'état vitaminique A (*Lespine et al. 1996*). Dans ce cas, les auteurs ont suggéré une régulation à la baisse ou bien une dégradation accélérée de l'ARNm du foie causée par la nutrition parentérale totale. Dans ce contexte, il est intéressant de mettre en parallèle une autre étude effectuée dans un modèle de cholestase induite par ligature du cholédoque, où la quantité totale d'ARNm de RBP était inchangée mais la distribution sub-cellulaire était modifiée (*Imamine et al. 1996*). En effet, seulement 36% de l'ARNm était fonctionnel (associé

aux polysomes liés à la membrane) chez les rats ligaturés par rapport à 80% chez les contrôles, expliquant le défaut de synthèse et les taux réduits de la RBP, dans le foie.

1.5.1.4 Formation du complexe de transport

La forte majorité du RBP-rétinol circule sous la forme d'un complexe auquel s'ajoute la TTR. Cette protéine tétramérique de plus haut poids moléculaire que la RBP (54 980 Da), servant au transport des hormones thyroïdiennes, possède une forte affinité et un site de liaison pour le RBP-rétinol, sur une de ses quatre sous-unités (*Ingenbleek et Young 1994*). La TTR est surtout synthétisée au niveau du foie et il est postulé que la formation du complexe RBP-TTR sert à prévenir la filtration glomérulaire de la RBP et son catabolisme rénal. En effet, lorsque non-liée à la TTR, la RBP diffuse rapidement des glomérules à la lumière tubulaire et en conditions normales, seules d'infimes quantités de RBP intacte sont retrouvées dans l'urine, ce qui suggère un catabolisme de la RBP au niveau des tubules rénaux avec recyclage de ces acides aminés (*Glover et al. 1974*).

Bien que la RBP et la TTR soient toutes deux synthétisées par le foie, on a toujours cru que la formation du complexe rétinol-RBP-TTR avait lieu suite à leur sécrétion respective dans le sang. Toutefois, de nouvelles études suggèrent que la liaison des deux protéines pourrait avoir lieu dans l'hépatocyte et le complexe sécrété comme tel. Utilisant des cellules en culture (HeLa) co-transfectées avec les gènes codant pour la RBP et la TTR, devenant ainsi aptes à exprimer ces protéines et à les sécréter dans le milieu de culture, *Melhus et al. (1991)* ont conclu que le complexe RBP-TTR était formé dans le réticulum endoplasmique. Cependant, en effectuant une simple transfection du gène de la RBP dans les cellules HeLa qui n'expriment pas la TTR, ces mêmes auteurs ont observé que la TTR n'était pas requise pour la sécrétion de RBP dans le milieu (*Melhus et al. 1992*). Plus récemment, une autre étude est venue appuyer l'hypothèse de la sécrétion du complexe protéique déjà formé dans le réticulum endoplasmique, par des cellules HepG2 et suggère un rôle régulateur de la TTR dans

la sécrétion de la RBP (*Bellovino et al. 1996*). De récentes observations chez des souris n'exprimant pas la TTR (produites par mutagénèse dirigée) tendent à supporter l'idée d'un blocage de la sécrétion de la RBP en absence de TTR, étant donné la baisse de RBP-rétinol sanguin parallèlement à l'accumulation hépatique de RBP (*Wei et al. 1995*).

1.5.2. Recyclage et utilisation du rétinol

On ne saurait exprimer le maintien des taux sanguins de rétinol par un simple équilibre entre l'entrée et la sortie du rétinol en circulation. Effectivement, le rétinol n'effectue pas un aller simple du foie vers les tissus périphériques, mais celui-ci subit un recyclage substantiel avant son utilisation irréversible par les tissus. Les premières observations à ce sujet ont été obtenues par *Vahlquist et al. (1972)* qui, à l'aide de courbes de disparition de [³H]-rétinol-RBP, ont estimé que le rétinol demeurait en circulation plus longtemps que la RBP. Selon un modèle de cinétique à compartiments multiples permettant d'obtenir une estimation quantitative, il a été calculé qu'une molécule de rétinol en circulation est recyclée de 7 à 9 fois avant d'être utilisée et ce, indépendamment de l'état nutritionnel en vitamine A (*Green et al. 1985*). Lors d'études subséquentes, le modèle a aussi prédit que, chez des rats normaux, le foie ne contribuait qu'à environ 20% du rétinol en circulation, environ 50% du rétinol étant fourni par les reins, et la balance par les autres tissus (*Green et Green 1987, Lewis et al. 1990*). Les reins contribuent donc de façon majeure au recyclage du rétinol. Par ailleurs, le fait que la demi-vie de la RBP soit plus courte que celle du rétinol suppose qu'une nouvelle synthèse de RBP soit nécessaire à la recirculation du rétinol. Dans cet ordre d'idée, la RBP et son ARNm ont été détectés dans plusieurs tissus extra-hépatiques, dont le rein, au niveau du segment S3 des tubules proximaux, et le tissu adipeux (*Kato et al 1985, Soprano et al. 1986, Makover et al. 1989*). Plusieurs organes seraient ainsi en mesure de mettre en circulation du rétinol recyclé lié à la RBP recyclée ou nouvellement synthétisée. D'autre part, le rein joue un rôle important dans le catabolisme de la RBP lorsqu'elle est dissociée de la TTR. La dégradation de la RBP

de même que la résorption du rétinol auraient vraisemblablement lieu au niveau du segment S1 des tubules proximaux, ceux-ci possédant un appareil endocytotique bien développé et riche en lysosomes (*Madsen et Tisher 1986*). Il est toutefois indéterminé comment le rétinol résorbé au niveau S1 pourrait se lier à la RBP synthétisée au niveau S3 des tubules rénaux.

1.5.3 Régulation de la rétinolémie

Tel que déjà mentionné, le rétinol sanguin est soumis à une homéostasie très bien contrôlée, dont on ne connaît pas encore tous les mécanismes. Cette homéostasie est réalisée de telle sorte que l'apport en rétinoïdes et les réserves totales de l'organisme ne sont pas reflétés par des variations dans les taux sanguins de rétinol, sauf dans les cas extrêmes de déficience ou d'ingestion excessive. C'est-à-dire qu'une concentration minimale de rétinoïdes hépatiques ($20 \mu\text{g/g}$ ou $0.07 \mu\text{mol/g}$ de foie) suffit à maintenir des taux sanguins normaux, prévenir tout signe clinique de déficience et servir de réserve, pour une période de 4 mois, à un individu dont la diète est inadéquate en vitamine A (*Olson 1987*). Seules des concentrations hépatiques sous cette valeur sont corrélées à des taux sanguins diminués de rétinol. Une mesure de rétinol plasmatique n'est donc utile à détecter que les déficiences franches et non les déficiences sub-cliniques. Une concentration élevée d'esters de rétinol libres ou non-liés à la RBP dans le sang sert, quant à elle, à dépister une hypervitaminose A.

La mobilisation du rétinol hépatique dépend en grande partie de la disponibilité de la RBP. Ainsi, les nombreux facteurs pouvant affecter la synthèse et la sécrétion de la RBP influencent indirectement les taux sanguins de rétinol. La régulation de la synthèse de la RBP a été abordée à la section 1.5.1.3. En ce qui concerne le contrôle de la sécrétion de la RBP, il a été mentionné plus tôt que la déficience en vitamine A n'entrave pas en soi la synthèse de RBP, mais par contre, inhibe sa sécrétion ce qui résulte en son accumulation dans le foie (*Soprano et al. 1992*). A l'aide de technique d'immuno-histochimie combinée à la microscopie électronique, il a été possible de

visualiser l'accumulation de la RBP au niveau du réticulum endoplasmique et son absence dans le complexe de Golgi et les vésicules de sécrétion, dans des cellules parenchymateuses de rats déficients en vitamine A (*Suhara et al. 1990*). Suite à une réplétion en rétinol, la RBP a rapidement transféré du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi et les vésicules de sécrétion vers la membrane plasmique.

La malnutrition protéino-énergétique est reconnue pour abaisser les taux circulants de rétinol-RBP. Deux raisons principales expliqueraient ce phénomène. Ce type de malnutrition, surtout rencontré chez les enfants, est généralement accompagné d'un apport faible en vitamine A menant à l'épuisement des réserves, donc à un défaut de sécrétion de la RBP. En second lieu, l'apport réduit en énergie et en acides aminés ne peut suffire à la synthèse protéique hépatique normale (*Soprano et Blaner 1994*). Cette dernière explication n'est pas spécifique à la RBP, mais à cause de sa courte demie-vie (12 jours, chez l'humain), elle est une des protéines les plus rapidement affectées. Pour cette raison, la RBP sert d'ailleurs souvent d'indice de malnutrition à court terme, et de marqueur relativement sensible d'un soutien nutritionnel (*Gibson 1990*).

Une hyporétinolémié est généralement observée lors de la déficience en zinc (*Solomons et Russell 1980, Goodman 1984*). Puisque les taux de RBP et de TTR circulants sont aussi diminués, il a toujours été assumé que le zinc était requis pour la synthèse de ces protéines (*Smith et al. 1974*). Cependant, une récente étude a rapporté des taux d'ARNm de TTR hépatique deux fois plus élevés chez des rats déficients en zinc que chez les contrôles. Quant à la RBP, son ARNm était sensiblement plus élevé chez les rats déficients en zinc, mais aussi chez leurs contrôles pairés («pair-fed»), indiquant non pas un effet spécifique du zinc, mais plutôt le résultat d'un apport alimentaire globalement réduit (*Kimball et al. 1995*). En effet, la déficience en zinc entraîne de l'anorexie qui mène à un faible poids corporel et souvent à un retard de croissance (*Carney et al. 1976*). L'ensemble de ces données suggère que les taux de RBP plasmatique réduits, typiques de la déficience en zinc, seraient possiblement expliqués par un défaut post-transcriptionnel lors de la synthèse hépatique, suite à une réduction de l'apport alimentaire.

Outre les facteurs nutritionnels, certaines hormones semblent moduler la sécrétion de RBP. Avec une culture primaire d'hépatocytes, Dixon et Goodman (1987a) ont démontré la nécessité de supplémenter le milieu de culture non seulement d'acides aminés, mais aussi de dexaméthasone, afin d'assurer une sécrétion normale de RBP, alors que l'addition de triiodo-L-thyronine et d'hormone de croissance n'a pas influencé la sécrétion de RBP. L'addition de dexaméthasone au milieu de culture d'hépatocytes provenant de rats déficients en vitamine A n'a pas cependant pu maintenir des taux de sécrétion de la RBP normaux, ce qui indique que la présence du ligand est primordiale (Dixon et Goodman 1987b). De plus, les pathologies chroniques ou aiguës du foie qui entraînent des modifications structurales et fonctionnelles, telle que la fibrose, peuvent engendrer des défauts de synthèse et de sécrétion de la RBP, en plus de réduire les réserves de rétinoïdes (Ramadori et al. 1991).

La sortie du rétinol de la circulation est vraisemblablement déterminée d'une part, par le captage et l'utilisation du rétinol par les tissus et d'autre part, par l'ultrafiltration du rétinol-RBP par le rein. De ce fait, les conditions qui augmentent le catabolisme de la RBP, telles que l'hyperthyroïdisme, les infections et les stress physiologiques, ont pour résultat une diminution des taux plasmatiques de rétinol (Underwood 1984). De la même façon, une protéinurie accrue par un syndrome néphrotique augmente l'excrétion de RBP et de rétinol et par conséquent, diminue les taux sanguins. Par contre, dans les conditions qui limitent la clairance glomérulaire, l'insuffisance rénale chronique par exemple, les taux plasmatiques de rétinol-RBP se voient augmentés (Underwood 1984).

Un rétinoïde synthétique, le *N*-(4-hydroxyphenyl)rétinamide (HPR), utilisé dans le traitement du cancer du sein, perturbe très rapidement les taux sanguins de rétinol et de RBP. Considéré non-toxique, ce dérivé a entraîné des symptômes de déficience en vitamine A, notamment de la cécité nocturne, chez des patients dont l'état en vitamine A était pourtant adéquat (Kaiser-Kupfer et al. 1986). Il s'est avéré que ce symptôme découlait d'un manque de rétinol disponible pour intégrer le cycle de la vision,

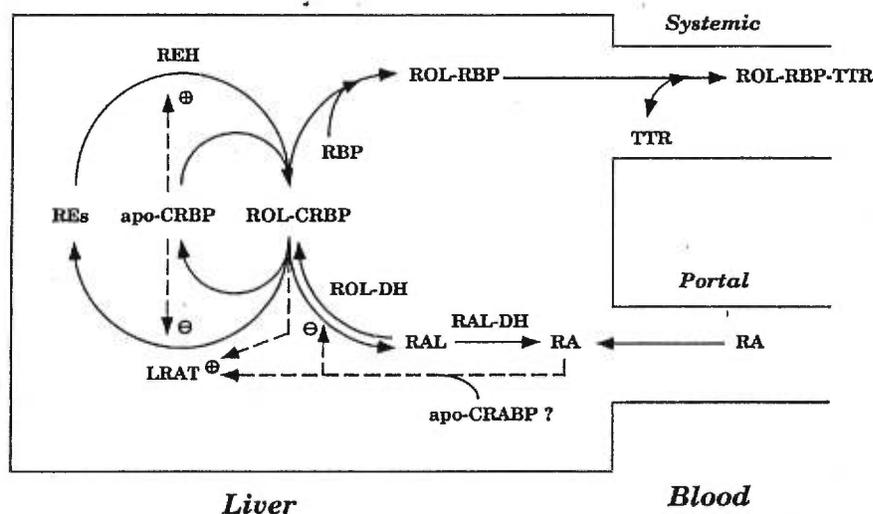
provenant d'une importante diminution des taux sanguins (*Dimitrov et al. 1990*). Ces taux sont en effet réduits considérablement 5 heures après une injection de HPR, chez des rats, alors que leurs réserves hépatiques de RBP sont augmentées (*Schaffer et al. 1993*). Ces derniers auteurs avaient d'abord conclu que le HPR empêchait la sécrétion de rétinol-RBP dans le sang et provoquait son accumulation dans le foie, mais il semble que le HPR bloquerait plutôt la formation normale du complexe rétinol-RBP en se liant lui-même à la RBP. Le complexe HPR-RBP, possédant moins d'affinité pour la TTR, serait rapidement accumulé et filtré par les reins (*Ritter et al. 1995*). Finalement, il semble que l'inhibition de la sécrétion de rétinol-RBP ne résulterait pas d'une simple compétition entre le rétinol et le HPR, mais que le HPR empêcherait le transport du rétinol jusqu'à la RBP, dans le réticulum endoplasmique (*Ritter et Smith 1996*).

En dernier lieu, quelques études ont rapporté un effet de l'acide rétinoïque sur les taux sanguins de rétinol. En effet, des études *in vivo* ont démontré qu'une augmentation des taux plasmatiques d'acide rétinoïque est associée à une diminution des taux circulants de rétinol. Ces observations ont été vérifiées autant dans les études où l'acide rétinoïque est administré par voie orale, chez le rat, (*Bhat et Lacroix 1986*) que dans celles où il est produit à partir du β -carotène en perfusion intestinale, chez le furet (*Wang. et al. 1993*). Bhat et Lacroix (*1991*) ont alors émis l'hypothèse que l'acide rétinoïque agirait en tant que signal rétroactif pour réduire les taux circulants de rétinol et ainsi épargner les réserves hépatiques. La rapidité de la réponse observée dans ces études rend invraisemblable la possibilité que l'acide rétinoïque agisse directement sur l'expression des protéines de transport du rétinol. Il est d'intérêt de mentionner que chez des souris déficientes en TTR, où le rétinol-RBP sanguin est considérablement réduit, les taux d'acide rétinoïque sanguins étaient parallèlement augmentés de 2.3 fois par rapport aux contrôles (*Wei et al. 1995*). Cependant, dans un modèle d'insuffisance rénale aigüe chez le rat, d'autres chercheurs n'ont pas trouvé d'effet significatif d'une injection intra-veineuse d'acide rétinoïque sur le rétinol sanguin. Par contre, une élévation d'environ 50% du rétinol sanguin a pu être observé suite à une injection d'apo-RBP, à ces mêmes rats (*Gerlach et Zile 1991*). Ces auteurs ont conclu que l'apo-

RBP, plutôt que l'acide rétinoïque, exercerait le rôle de signal rétroactif des tissus périphériques pour empêcher la relâche hépatique de rétinol.

A partir d'incubations de fractions microsomales et cytosoliques de foie de furets avec ou sans acide rétinoïque, Wang *et al.* (1993) ont observé une rétroaction négative de la conversion du rétinol en rétinol par l'acide rétinoïque, de même qu'une stimulation de l'estérification du rétinol. Ces auteurs ont ainsi élaboré un modèle de régulation rétroactive de l'acide rétinoïque sur les étapes hépatiques affectant la mise en circulation du rétinol (voir la figure 4). Ce modèle suggère que l'inhibition de la conversion du rétinol en rétinol résulterait en une augmentation de la holo-RBP, laquelle, en tant que substrat préférentiel de la LRAT, accélérerait l'estérification du rétinol. La réduction concomittante de l'apo-CRBP (puisque la holo-RBP est en équilibre avec le rétinol libre) diminuerait à la fois son action stimulatrice de l'activité REH et son action inhibitrice de la LRAT. En conséquence, l'estérification du rétinol constituerait la voie privilégiée réduisant ainsi la mise en circulation du rétinol.

Figure 4. Régulation rétroactive de la rétinolémie par l'acide rétinoïque



(tiré de Wang *et al.* 1993)

1.6 Métabolisme cellulaire

Dans les cellules où les rétinoïdes exercent des fonctions physiologiques, le rétinol retiré de la circulation empruntera l'une des diverses voies métaboliques possibles, ceci étant probablement déterminé par les besoins immédiats. En premier lieu, le rétinol peut être estérifié afin d'assurer sa mise en réserve temporaire et les esters de rétinol entreposés peuvent subir une hydrolyse dans le but de réactiver le rétinol. Ces aspects ont déjà été traités dans le cadre du métabolisme hépatique, aux sections 1.4.3 et 1.4.1, respectivement. En second lieu, le rétinol peut être converti en sa forme active, soit l'acide rétinoïque, soit le rétinol dans le cas de l'oeil. Finalement, il peut être catabolisé sous une forme moléculaire facilement excrétable par l'organisme. Sans qu'on en connaisse les mécanismes régulateurs précis, il est généralement reconnu, depuis quelques années, que le cheminement du rétinol et de l'acide rétinoïque à l'intérieur de la cellule est largement déterminé par les protéines de transport intracellulaire, CRBP et CRABP.

1.6.1 Entrée du rétinol dans les cellules-cibles

Le captage du rétinol par les cellules des tissus extrahépatiques constitue la première étape régulatrice du métabolisme cellulaire subséquent et des fonctions exercées par les rétinoïdes. Malheureusement, cet aspect est, encore à ce jour, mal défini, ceci venant de la perpétuelle controverse entourant la présence ou non d'un récepteur spécifique pour la RBP. Mais avant d'aborder ce point, il est à souligner que la TTR semble exercer un rôle modulateur de la relâche du rétinol du complexe rétinol-RBP-TTR. Les études cinétiques de Noy *et al.* (1992) suggèrent que la dissociation du complexe débute par le détachement du rétinol, suivie de la dissociation des deux protéines mais seulement après que le complexe apo-RBP-TTR ait circulé pendant un certain temps dans le sang. Aussi, la vitesse de dissociation du rétinol à partir du complexe RBP-TTR était environ 2.5 fois plus lente que sa dissociation de la RBP seule, suggérant ainsi un rôle régulateur de la TTR dans le maintien de la rétinolémie.

Plusieurs groupes de chercheurs ont suggéré l'existence d'un récepteur potentiel pouvant lier la RBP, dans la plupart des cas, à partir d'études de liaison de la [¹²⁵I]-RBP sur divers types cellulaires en culture, incluant des cellules de carcinomes de souris (F9) (Eriksson *et al.* 1986), des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine humaine (Pfeffer *et al.* 1986), des coupes et des membranes de placenta humain (Törmä *et Valquist* 1986, Sivaprasadarao *et Findley* 1988), des cellules de Sertoli de rats (Shingleton *et al.* 1989) et du plexus choroïde de rat (MacDonald *et al.* 1990). Cependant, aucune de ces études n'a pu caractériser la nature biochimique d'un tel récepteur, celui-ci n'ayant pu être isolé et purifié de façon satisfaisante. Plus récemment, Båvik *et al.* (1991) ont décrit la purification et la caractérisation partielle d'un récepteur protéique (de 63 kD) pour la RBP, à partir de membranes microsomales de l'épithélium pigmentaire de la rétine de bovin. Il a ensuite été démontré, grâce à l'élaboration d'anticorps monoclonaux couplée à des analyses d'immunobuvardage (Western blot), que le récepteur serait exclusivement localisé dans ces cellules, vu qu'il n'a pu être détecté dans des préparations membranaires de foie, rein, poumon, rate, muscle, glandes surrénales et plexus choroïde (Båvik *et al.* 1992). Bien que prometteuse, la pertinence physiologique de ce récepteur demeure incertaine puisqu'il a été purifié à partir de fractions membranaires microsomales et non pas plasmiques et de plus, qu'il soit absent de tissus qui entreposent pourtant de larges quantités de rétinoïdes.

Contrastant avec les études mentionnées, bon nombre d'auteurs ont rapporté, non seulement l'impossibilité de détecter un récepteur membranaire pour la RBP, mais ont aussi remis en question la nécessité d'un tel récepteur pour le captage du rétinol par les cellules. Ainsi, Creek *et al.* (1989) ont noté une accumulation de rétinol de 15 à 20 fois supérieure dans des kératinocytes de souris incubés avec du [³H]-rétinol seulement comparativement au rétinol lié à la RBP. D'autres chercheurs n'ont pu démontrer de liaison spécifique et saturable de la [¹²⁵I]-RBP à des kératinocytes humains (Hodam *et al.* 1991), à des cellules d'hépatocarcinomes (HepG2), à des carcinomes mammaires (MCF-7) humains (Randolph *et Ross* 1991), ni à des hépatocytes isolés de rat (*van*

Bennekum et al. 1993). Le transfert du rétinol de la RBP à la surface cellulaire a été étudié à l'aide de liposomes. Il a été trouvé que ce transfert était rapide, spontané et dépendait autant de la concentration en rétinol-RBP qu'en phospholipides membranaires (*Fex et Johannesson 1987, 1988*). De la même façon, Noy et Xu (*1990a, 1990b*) ont démontré que le passage et la dissociation du rétinol de la membrane s'effectuait très rapidement, en moins d'une seconde. A partir de ces observations et des constantes d'association et de dissociation du rétinol avec la CRBP, Noy et Blaner (*1991*) ont élaboré un modèle hypothétique de captage du rétinol par les cellules-cibles, ne nécessitant pas de récepteur pour la RBP. Le modèle prédit que la quantité de rétinol qui est incorporé dans la cellule (de même que sa sortie) sera déterminée par les taux d'apo-CRBP par rapport aux taux d'holo-CRBP intracellulaires. En bref, le rétinol se dissocie du complexe circulant RBP-TTR, traverse la membrane bilipidique par un mécanisme de «flip-flop» et s'associe à la CRBP au niveau de la couche membranaire interne. Les taux de CRBP libre ou lié seraient déterminés par la synthèse endogène de la protéine, elle-même modulée par l'état nutritionnel en vitamine A, et aussi par le métabolisme du rétinol, puisque la CRBP dirige le rétinol vers ses diverses voies métaboliques, i.e. hydrolyse, oxydation et estérification.

1.6.2 Formation et métabolisme de l'acide rétinoïque

Quoique l'acide rétinoïque assure la presque totalité des fonctions des rétinoïdes, la régulation de sa synthèse intracellulaire, des taux sanguins et la contribution de l'acide rétinoïque du plasma aux pools tissulaires sont encore mal définis. Mais, une homéostasie bien contrôlée des concentrations plasmatiques et cellulaires est fortement soupçonnée, car ces concentrations sont faibles par opposition au rétinol plasmatique et aux rétinyl esters tissulaires et l'acide rétinoïque démontre des effets toxiques à fortes doses (*Blaner 1994*). Une récente étude a quantifié la contribution de l'acide rétinoïque plasmatique à divers pools tissulaires, en infusant du *trans*-[³H]-acide rétinoïque à des rats, jusqu'à l'obtention d'un plateau. Il a été estimé que la majorité de l'acide rétinoïque retrouvé dans le foie et le cerveau était dérivée de la circulation, soit 78%

et 88 %, respectivement, entre 20 et 30 % pour le rein, la rate et les tissus adipeux épидидymal et périrénal et finalement, que l'acide rétinoïque circulant contribuait très peu aux pools pancréatique et testiculaire (*Kurlandsky et al. 1995*).

1.6.2.1 Voie d'oxydation du rétinol

La formation enzymatique de l'acide rétinoïque dans les tissus n'est pas encore clairement définie, en grande partie à cause de la multitude d'enzymes pouvant oxyder le rétinol, mais l'ensemble des auteurs appuie l'oxydation en deux étapes, à partir du rétinol, via la formation de rétinol (*Blaner 1994*). La conversion du rétinol en rétinol, une réaction réversible, a été démontrée in vitro par plusieurs enzymes cytosoliques et peu spécifiques, tel que l'alcool déshydrogénase (ADH de classes I et II). Même si ces enzymes peuvent effectivement catalyser la formation de rétinol, des études impliquant des souris qui n'expriment pas l'ADH ("deermouse") ou de fortes concentrations d'inhibiteurs de ces classes d'ADH ont malgré tout, révélé la production de rétinol par des isozymes de rétinol déshydrogénase (RoDH) cytosoliques (*Posch et al. 1989, 1992*). Cette dernière enzyme semble beaucoup plus spécifique puisqu'elle utilise comme substrat le rétinol lié à la CRBP et son activité se voit inhibée en présence d'apo-CRBP (*Ottonello et al. 1993, Boerman et Napoli 1996*).

Mais, c'est plutôt une RoDH microsomale qui assure la part majoritaire de la production de rétinol, à partir de rétinol-CRBP comme substrat spécifique, soit environ 93 % de la synthèse totale (*Boerman et Napoli 1996*). Les isoenzymes microsomales de RoDH utilisent préférentiellement le NADP⁺ comme co-facteur, ne sont pas inhibées par l'apo-CRBP, font la distinction entre différents isomères de rétinol, mais ne convertissent pas le 9-*cis* et 13-*cis*-rétinol en leurs aldéhydes respectifs (*Boerman et Napoli 1995*). Trois classes d'isoenzymes de RoDH microsomales de rat ont été identifiées à ce jour et font partie d'une superfamille de déshydrogénases impliquées notamment dans le métabolisme des stéroïdes et des prostaglandines (*Chai et al. 1995, 1996*). Les trois classes d'isoenzymes présentent une forte homologie dans leur

séquence d'acides aminés et sont exprimées de façon distincte dans divers tissus. Des données préliminaires ont démontré la co-expression tissulaire et temporelle de l'ARNm des RoDH avec celui de la CRBP, renforçant ainsi leur lien physiologique dans la production d'acide rétinoïque au cours du développement (*Napoli 1996*).

La seconde réaction dans la production de l'acide rétinoïque, l'oxydation du rétinol, constitue une étape irréversible. Au moins quatre activités rétinol déshydrogénases (RalDH) ont été mesurées dans le cytosol de différents tissus et deux de ces enzymes sont clonées (les RalDH I et II) (*Napoli et al. 1995, Wang et al. 1996*). Il s'est avéré que chacune de ces enzymes accepte pour substrat le rétinol généré *in situ* de l'oxydation du rétinol-CRBP par les rétinol déshydrogénases microsomiales, faisant d'elles des candidates physiologiques pour la synthèse d'acide rétinoïque. La RalDH I possède une spécificité de substrat intéressante en ce qu'elle reconnaît le *trans*-rétinol et le 9-*cis*-rétinol, et non le 13-*cis*-rétinol, suggérant qu'elle puisse participer à la synthèse de 9-*cis*-acide rétinoïque (le ligand exclusif des RXR_α) (*El Akawi et Napoli 1994*). Cinq autres aldéhyde déshydrogénases ont été purifiées et certaines clonées, mais n'ont pas été évaluées en regard de leur capacité à oxyder le rétinol produit à partir du rétinol-CRBP (*Lee et al. 1991, Dockham et al. 1992, Labrecque et al. 1995, Saari et al. 1995*).

1.6.2.2 Métabolites du rétinol et de l'acide rétinoïque

Plusieurs isomères et métabolites du rétinol ont été identifiés, dont certains possèdent une activité biologique alors que d'autres représentent uniquement des produits de catabolisme (voir figure 1.). L'isomérisation de l'acide rétinoïque en 9-*cis*-acide rétinoïque constitue certainement une voie qui mérite l'intérêt qu'elle suscite à l'heure actuelle, puisque cet isomère a été récemment identifié comme le ligand principal et puissant activateur des récepteurs nucléaires RXR_α (*Levin et al. 1992, Heyman et al. 1992, Mangelsdorf et al. 1992*). La formation de 9-*cis*-acide rétinoïque, formé soit par l'isomérisation du *trans*-acide rétinoïque ou par clivage du 9-*cis*-β-carotène, tel que

démontré dans la muqueuse intestinale humaine (*Wang et al. 1994*) serait donc une étape cruciale des fonctions des rétinoïdes. La présence de 13-*cis*-acide rétinoïque a d'abord été détectée dans la muqueuse et la couche musculuse intestinale ainsi que dans le plasma de rats (*Cullum et Zile 1985*), puis comme composante endogène du plasma humain (*Tang et Russell 1990*). Ces derniers auteurs ont montré que les taux de 13-*cis*-acide rétinoïque augmentent suite à l'ingestion d'une dose de rétinyl palmitate (*Tang et Russell 1991, Eckhoff et al. 1991*). Bhat et Jetten (*1987*) ont rapporté la production de cet isomère à partir de *trans*-acide rétinoïque, dans des cellules de l'épithélium trachéal de lapins.

Une autre voie métabolique, identifiée dans la peau chez l'humain, concerne des réactions de déhydrogénase du noyau cyclohexène de la molécule de rétinoïde formant des 3,4-didéhydro-rétinol et les esters correspondants (*Thorma et Valquist 1985, 1987*). Il a été proposé que le 3,4-didéhydro-acide rétinoïque soit activement impliqué dans le développement morphologique, puisque sa génération en deux étapes à partir du 3,4-didéhydro-rétinol a été rapportée dans l'aile embryonnaire de poulet (*Thaller et Eichele 1990*). Par ailleurs, la formation de *rétro*-rétinoïdes hydroxylés constitue un chemin métabolique nouvellement mis à jour dans des lymphocytes B en culture. En effet, Buck *et al.* (*1991a, 1991b*) ont montré que le 14-hydroxy-4,14-*rétro*-rétinol, un métabolite naturel du rétinol, était essentiel à la croissance de ces cellules, qui ne peut être assurée par l'acide rétinoïque (*Buck et al. 1990*).

Le rétinol et l'acide rétinoïque peuvent aussi subir une glucuronidation pour produire le rétinyl- et rétinoyl- β -glucuronide, respectivement. Ces glucuronides sont synthétisés entre autres tissus, dans le foie, l'intestin et le rein, à partir de l'acide diphosphoglucuronique, par une glucuronide transférase microsomale (*Lippel et Olson 1968, Frolik 1984*). Biologiquement actif dans la croissance d'animaux déficients en vitamine A, dans la différenciation de cellules épithéliales et comme traitement topique de l'acné chez l'humain, le rétinoyl- β -glucuronide ne se lie pourtant pas aux protéines

de transport intracellulaire ni aux récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (*Mehta et al. 1992, Sani et al. 1992*). Comparativement à l'acide rétinoïque, ce métabolite est très peu toxique et non tératogène lorsqu'administré oralement, probablement en raison de sa faible absorption intestinale, sa lente hydrolyse en acide rétinoïque et sa faible perméabilité placentaire (*Formelli et al. 1996*). Environ un tiers des glucuronides excrétés dans la bile sont réabsorbés, constituant ainsi une recirculation entéro-hépatique des rétinoïdes (*Zachman et al. 1966, Zile et al. 1982, Olson et al 1992*).

Une voie catabolique importante du rétinol et de l'acide rétinoïque est assurée par le système microsomal d'oxydases dépendantes du cytochrome P-450, générant les 4-hydroxy- et 4-oxo- dérivés du rétinol et de l'acide rétinoïque (*Leo et al. 1989, Roberts et al. 1992*). En produisant ces métabolites polaires facilement excrétables, cette voie pourrait constituer un facteur de régulation du métabolisme de l'acide rétinoïque, car l'utilisation d'inhibiteurs du P-450 a provoqué une augmentation des taux sanguins d'acide rétinoïque de 1.7 nmol/L à 10-15 nmol/L (*van Wauwe et al. 1992*).

1.6.3 Rôles des protéines de transport intracellulaire

Il a été question succinctement, tout au long de cet exposé, de certaines implications des protéines de transport intracellulaire du rétinol et de l'acide rétinoïque; leurs rôles respectifs seront ici traités de façon intégrée à l'ensemble du métabolisme des rétinoïdes. Deux protéines liant le rétinol, les CRBP I et II, et deux autres liant l'acide rétinoïque, les CRABP I et II, sont aujourd'hui identifiées et caractérisées. Quoiqu'elle ne fasse pas partie de la même famille, une cinquième protéine spécifique au rétinol a été trouvée dans l'oeil, exclusivement, mais ne fera pas l'objet de discussion ici (*Saari 1994*).

La distribution tissulaire diffère selon les protéines: la CRBP I est répandue dans plusieurs tissus et se concentre particulièrement dans des cellules qui entreposent et métabolisent de grandes quantités de rétinoïdes, telles que les cellules étoilées du foie et les cellules de l'épithélium pigmentaire (*Ong et al. 1994*), alors que l'on retrouve la

CRBP II dans les entérocytes seulement, chez l'adulte (Crow et Ong 1985). De la même façon, la CRABP I est largement distribuée, mais la CRABP II est uniquement retrouvée dans la peau, toujours chez l'adulte (*Elder et al. 1992*), suggérant des propriétés fonctionnelles différentes entre les types I et II des protéines d'une même paire. L'expression du gène respectif des CRBP I et II semble faire l'objet d'une régulation par l'état nutritionnel en vitamine A. En effet, chez des rats rendus déficients en vitamine A, les taux de CRBP I et de son ARNm étaient diminués dans les poumons, la rate, les testicules et l'intestin grêle, alors que ces taux étaient peu affectés dans le foie, le rein et l'épididyme (*Kato et al. 1985, Rajan et al. 1990*). La réplétion en rétinol a pu ramener l'expression de la CRBP à la normale. De plus, un apport alimentaire en acide rétinoïque, en l'absence de rétinol, a suffi à maintenir des taux normaux de CRBP (*Blaner et al. 1986*). Il ressort de ces observations que la diminution de la CRBP dans la déficience en vitamine A ne serait pas causée par un manque de rétinol en soi, mais plutôt par l'absence d'acide rétinoïque (*Ong et al. 1994*). Au contraire de la CRBP, les taux de CRBP II étaient augmentés d'environ 42% dans l'intestin grêle, par l'acide rétinoïque (*Rajan et al. 1991*). Une réponse rapide de l'expression de la CRBP par un apport en acide rétinoïque chez des animaux et des cellules en culture (*Haq et al. 1988, Rush et al. 1991, Fisher et al. 1995*) peut être expliquée par l'induction directe du gène de la CRBP par l'acide rétinoïque, grâce à un élément de réponse situé dans la région promotrice (*Hushman et al. 1992, Smith et al. 1991*). Cet élément de réponse a aussi été identifié sur le gène de la CRBP II, mais son induction par l'acide rétinoïque apparaît spécifique au type cellulaire (*Mangelsdorf et al. 1991, Nakshatri et al. 1994*). Par ailleurs, les glucocorticoïdes semblent exercer un effet inhibiteur sur les taux d'ARNm de CRBP I (*Rush et al. 1991*). L'expression de la CRBP II serait stimulée par la prise alimentaire et particulièrement, par les acides gras insaturés (*Goda et al. 1994, Sugura et al. 1995*), mais serait réduite par la 1,25-dihydroxy vitamine D (*Finlay et al. 1990*). Les gènes des CRABP I et II semblent être induits par l'acide rétinoïque, du moins très tôt dans le développement embryonnaire pour la CRABP I (*Åström et al. 1991, Harnish et al. 1992*) et dans la peau humaine pour la CRABP II (*Tavakkol et al. 1992*). Il semble que la distribution de même que la régulation de l'expression des différentes protéines de

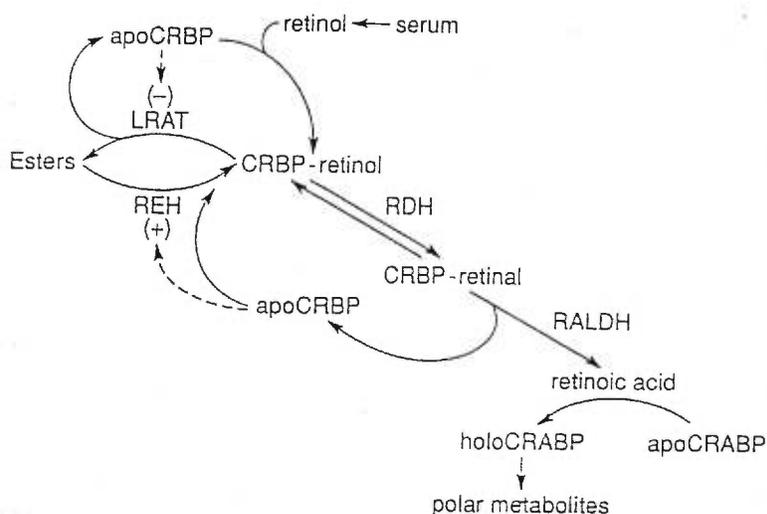
transport intracellulaire des rétinoïdes reflètent des fonctions spécifiques de ces protéines selon le type cellulaire.

Il a d'abord été postulé que les protéines intracellulaires servaient de simples réservoirs visant à maintenir à un niveau minimal les taux de rétinoïdes libres, de sorte à préserver la cellule contre les propriétés de type détergent des rétinoïdes libres et, étant eux-mêmes des molécules labiles, à les protéger d'une dégradation non-spécifique. Mais, il apparaît maintenant évident que ces protéines servent non seulement de transporteurs des rétinoïdes vers leurs sites métaboliques, mais agissent aussi en tant que modulateurs du métabolisme des rétinoïdes, étant activement impliquées dans la réduction du rétinol, l'estérification du rétinol, l'hydrolyse des esters de rétinol et la synthèse de l'acide rétinoïque. Dans chacune de ces voies, les protéines de transport semblent diriger les rétinoïdes vers certaines réactions enzymatiques en les rendant inaccessibles pour d'autres, les premières représentant probablement les voies physiologiques importantes du métabolisme. Les rôles régulateurs connus de ces protéines ont été intégrés dans un modèle illustrant les liens entre les divers aspects du métabolisme des rétinoïdes (voir la figure 5).

En effet, dans l'entérocyte, la CRBP II privilégie la réduction du rétinol, généré par le clivage des caroténoïdes, en rétinol, par une réductase microsomale plutôt qu'une réductase cytosolique non-spécifique (*Kakkad et Ong 1988*). En outre, le taux de réduction du rétinol ne semble pas contrôlé par la présence d'apo-CRBP II, ce qui permet probablement d'assurer un maintien de la production de rétinol en conditions d'apport faibles en caroténoïdes. Si l'apoprotéine compétitionnait avec la CRBP II-rétinol pour la reconnaissance par la réductase, la formation de rétinol s'en trouverait retardée de même que tout son métabolisme subséquent (*Ong 1993*). D'autre part, il a été démontré, à l'aide de cellules Caco-2 intestinales transfectées de sorte à surexprimer la CRBP II, que le taux d'absorption et d'estérification du rétinol était directement relié à la quantité de CRBP II dans ces cellules (*Levin et al. 1993, Lissos et al. 1995*).

Figure 5. Modèle de régulation du métabolisme des rétinoïdes par les protéines de transport intracellulaire

Lorsque lié à la CRBP, le rétinol est dirigé vers la voie d'estérification, puisque la CRBP-rétinol induit l'activité de la LRAT hépatique. Au contraire, l'apo-CRBP inhibe cette réaction et stimule la réaction inverse, c'est-à-dire, l'hydrolyse des rétinyl esters mis en réserve. La CRBP-rétinol active aussi la réduction du rétinol en rétinol, première étape de la formation de l'acide rétinoïque. La destinée du rétinol dépend ainsi du ratio apo-CRBP/holo-CRBP. Enfin, selon ce modèle, la CRABP servirait à diriger l'acide rétinoïque vers son catabolisme en métabolites polaires.



(tiré de Napoli 1996)

Les CRBP I et II sont directement impliquées dans l'estérification du rétinol, au niveau du foie et de l'intestin, respectivement. Dans les deux cas, ces protéines liées au rétinol agissent en tant que substrat de la LRAT, alors qu'elles n'induisent pas l'activité de l'ARAT, induite seulement par le rétinol libre (Ong *et al.* 1987, Herr *et Ong* 1992, Ong *et al.* 1994). La différence majeure dans la modulation de l'activité de la LRAT intestinale versus hépatique réside dans son inhibition par l'apoprotéine correspondante. Effectivement, un excès d'apo-CRBP II par rapport à la CRBP II-rétinol diminue peu le taux d'estérification du rétinol, dans l'entérocyte. Ceci, comme dans le cas de la réductase ci-haut mentionnée, permettrait de maintenir l'estérification du rétinol en esters de rétinol, éventuellement incorporés dans les chylomicrons, même dans des conditions où l'apport en vitamine A est faible et la CRBP II n'est pas

complètement saturée. Au contraire, l'apo-CRBP, dans un excès molaire de 2 par rapport à la CRBP-rétinol, agit comme puissant inhibiteur de la LRAT hépatique, diminuant l'estérification du rétinol d'environ 80% (*Herr et Ong 1992*). Ce mécanisme viserait à atténuer la mise en réserve du rétinol lors d'apports réduits, de sorte à le rendre disponible à la mise en circulation lié à la RBP, afin d'assurer sa distribution aux tissus périphériques.

De concert avec son activité inhibitrice de la LRAT, l'apo-CRBP stimule la réaction inverse, c'est-à-dire, l'hydrolyse des esters de rétinol entreposés dans le foie, tel que démontré *in vitro*, dans des microsomes hépatiques de rats (*Boerman et Napoli 1991*). Cette propriété semble spécifique à l'apo-CRBP, puisque d'autres protéines capables de lier le rétinol (la β -lactoglobuline et l'albumine sérique) n'ont pas pu stimuler l'activité d'hydrolyse. L'enzyme concernée par cette stimulation spécifique est la REH indépendante des acides biliaires, initialement décrite par Harrison et Gad (*1989*), représentant ainsi la candidate la plus plausible de l'hydrolyse des réserves hépatiques de rétinoïdes pour la relâche du rétinol en circulation.

Finalement, la CRBP-rétinol est intimement impliquée dans la biosynthèse de l'acide rétinoïque dans plusieurs tissus (voir section 1.6.2.1) en se liant de façon covalente et spécifique à la rétinol déhydrogénase (RoDH) microsomale, pour activer la réduction du rétinol en rétinal (*Boerman et Napoli 1995*). L'étape finale de la formation de l'acide rétinoïque fait appel à une rétinal déhydrogénase (RalDH) cytosolique, dont au moins quatre isozymes ont été décrits (*Posch et al. 1992*). Comme la CRBP peut lier le rétinal, quoiqu'avec une moins grande affinité que le rétinol, et que la CRBP-rétinal peut assurer la synthèse cytosolique d'acide rétinoïque, il est postulé que le transfert du rétinal de la RoDH à la RalDH serait médié par la CRBP (*Napoli 1996b*).

En ce qui concerne les CRABP I et II, leurs rôles fonctionnels précis, soit de diriger l'acide rétinoïque vers le noyau où il sera lié aux récepteurs nucléaires ou soit vers son métabolisme catabolique, ne sont pas encore clairement définis. De plus, certaines

observations ont démontré que ces protéines modulent aussi le métabolisme de l'acide rétinoïque. La CRABP I semble impliquée dans la formation de métabolites de l'acide rétinoïque via l'activité du cytochrome P-450 (*Fiorella et Napoli 1994*). Son effet modulateur a été étudié dans des cellules souches de tératocarcinomes (F9) transfectées de façon à surexprimer la CRABP I, où la demie-vie de l'acide rétinoïque était fortement réduite par rapport aux cellules normales (*Boylan et Gudas 1991, 1992*). Il est d'intérêt de souligner que des souris transgéniques qui expriment les CRABP plus que des souris normales développent toute une gamme de pathologies, allant de malformations à la stérilité (*Perez-Castro et al. 1993, Wei et al. 1992*). Au contraire, des souris transgéniques n'exprimant pas l'une ou l'autre de ces protéines montrent un phénotype apparemment normal, à l'exception d'un doigt supplémentaire aux membres supérieurs des souris déficientes en CRABP II, appuyant le rôle probable de cette protéine dans le développement embryonnaire (*de Bruijn et al. 1994, Fawcett et al. 1995, Lampron et al. 1995*). De plus, ces souris sont insensibles à un excès normalement tératogène d'acide rétinoïque, suggérant que celui-ci est métabolisé par des voies non-spécifiques en l'absence de CRABP.

1.7 Rétinoïdes et expression des gènes

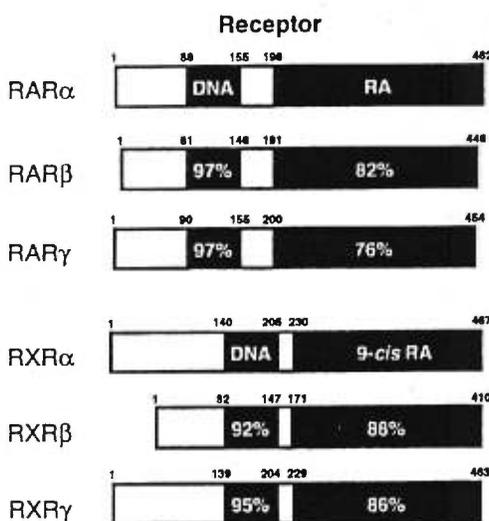
1.7.1 Récepteurs nucléaires pour l'acide rétinoïque

Une étape importante dans la compréhension des mécanismes d'action des rétinoïdes a été franchie lors de la découverte des récepteurs nucléaires pour l'acide rétinoïque (RAR), simultanément par deux groupes de chercheurs, il y a dix ans (*Giguère et al. 1987, Petkovitch et al. 1987*). Trois membres de cette famille de récepteurs, ayant pour principal ligand le *trans*-acide rétinoïque, sont aujourd'hui identifiés: les RAR α , β et γ , comprenant chacun plus d'une isoforme (voir Mangelsdorf et al. 1994 pour références complètes). Quelques années plus tard, une autre famille de récepteurs nucléaires aux rétinoïdes a été identifiée, sans qu'on en connaisse toutefois le ligand, nommée «retinoid X receptors» (RXR) (*Mangelsdorf et al. 1990*). Il s'est avéré que si le *trans*-acide rétinoïque, en quantités millimolaires, pouvait activer les RXR, son

isomère, le 9-*cis*-acide rétinoïque pouvait lier ces récepteurs avec une plus grande affinité et une plus forte puissance d'activation (Heyman *et al.* 1992, Levin *et al.* 1992). La famille des RXR comprend aussi trois membres, α , β et γ . La distribution tissulaire des RAR α et RXR β s'avère très vaste, autant chez l'organisme adulte qu'embryonnaire, alors qu'elle est plus restreinte pour les autres isoformes, indiquant des rôles régulateurs spécifiques aux tissus et au stade de développement. Appartenant à une superfamille de récepteurs nucléaires pour les hormones, dont les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes (T₃R), la 1,25-dihydroxy vitamine D (VDR) et les agents activateurs de la prolifération des péroxisomes (PPAR), ces récepteurs présentent une forte homologie structurale. Même s'ils sont apparentés, il existe cependant une grande disparité dans la structure des gènes des RAR et des RXR. Ainsi, il existe une plus forte homologie entre le récepteur aux hormones thyroïdiennes et les RAR qu'entre les RXR et les RAR, par exemple (Mangelsdorf 1994).

Figure 6. Gènes des récepteurs pour l'acide rétinoïque

Les gènes de la superfamille de récepteurs nucléaires aux hormones se divisent en six domaines (A à F), dont les mieux caractérisés sont le domaine liant l'ADN (domaine C) et celui liant le ligand respectif (domaine E). Le domaine liant l'ADN présente la plus grande conservation dans sa séquence d'acides aminés, tel qu'illustré par le pourcentage d'identité entre les différents gènes.

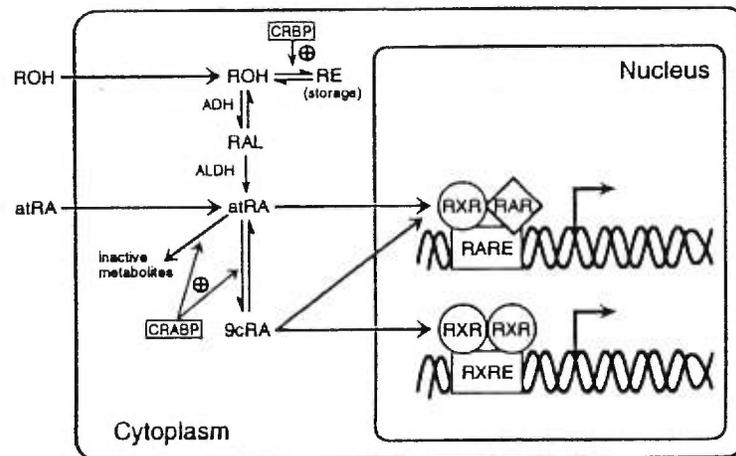


(adapté de Mangelsdorf 1994)

Les RAR et RXR modulent l'expression de plusieurs gènes en se liant, par leur domaine C, à des éléments de réponse (RARE et RXRE) situés dans la région promotrice des gènes sensibles aux rétinoïdes. Cette liaison s'effectue grâce à deux liens de type «zinc fingers». Les récepteurs agissent en formant des homo- ou hétérodimères, qui comprennent au moins un RXR, et possèdent la capacité de dimérisation avec d'autres récepteurs nucléaires membres de la même superfamille, dont certains récepteurs dits «orphelins», leur ligand spécifique n'étant pas encore connu. Les éléments de réponse aux hormones sont constitués de séquences consensus configurées en une variété de motifs incluant des séquences répétitives ou palindromiques, séparées par 1, 2, 3, 4, 5, 8 ou 9 paires de bases (*Chambon 1996*). Le type de séquence ainsi que le nombre de paires de bases qui les séparent confèrent à chaque élément de réponse le pouvoir d'activer ou au contraire, de réprimer la transcription du gène. Par exemple, le dimère formé de RXR-RAR se liant à un hRE donné, séparé par 2 paires de bases aura pour effet d'activer l'expression d'un gène, alors que le même dimère se liant à un hRE séparé d'une seule paire de base produira l'effet contraire (*Chambon 1996*). Le fait que les RXR puissent former des hétérodimères avec plusieurs autres récepteurs nucléaires laisse entrevoir un réseau complexe d'interactions croisées entre les rétinoïdes et d'autres hormones, sans compter les ligands encore inconnus de récepteurs orphelins, pour assurer la régulation de l'expression des gènes. Par surcroît, les RAR et RXR peuvent interagir directement avec d'autres facteurs de transcription, tel que le facteur AP-1 («activator protein 1»), le produit de deux proto-oncogènes *c-Fos* et *c-Jun* (*Pfhal et Chytil 1996*). En se liant à son élément de réponse, le facteur AP-1 module l'expression de facteurs de croissance, de peptides inflammatoires, d'oncogènes et d'agents promoteurs de tumeurs, induisant généralement la prolifération cellulaire. Mais, en présence de leurs ligands, les RAR et RXR peuvent interagir avec l'AP-1 et inhiber son activité et vice-versa, l'AP-1 peut bloquer l'activité des RAR et RXR par le même mécanisme (*Schüle et al. 1991, Yang Yen et al. 1991, Salbert et al. 1993*). En somme, le passage d'une cellule d'un stade de différenciation à un stade de prolifération, pourrait s'expliquer en partie par l'équilibre entre les concentrations de récepteurs nucléaires et de facteur AP-1, éclairant ainsi l'implication des rétinoïdes dans la carcinogénèse.

Figure 7. Contrôle de l'expression des gènes par les rétinoïdes

Dans le cytoplasme, le rétinol est transformé irréversiblement en acide rétinoïque. Le *trans*-acide rétinoïque (atRA) se lie au RAR alors que le 9-*cis*-acide rétinoïque (9cRA) lie préférentiellement le RXR, dans le noyau. Les hétéro- et homodimères formés se lient ensuite à des éléments de réponse respectifs (RARE et RXRE), situés dans la région promotrice des gènes afin de moduler leur expression.



(tiré de Mangelsdorf 1994)

1.7.2 Gènes modulés par l'acide rétinoïque

Étant donné toutes les permutations possibles entre les différents RAR, RXR et les autres récepteurs de la même famille, il n'est pas étonnant de constater la quantité toujours croissante de protéines dont l'expression du gène est modulé par les rétinoïdes. Seront énumérés ici quelques-uns de ces gènes impliqués dans divers systèmes biologiques tels que le métabolisme des rétinoïdes lui-même (signifiant une auto-régulation), la morphogénèse, le système immunitaire, le métabolisme des lipides, certaines hormones et des protéines structurales. Ce tableau vise à donner un aperçu de l'étendue des fonctions régulatrices des rétinoïdes, mais ne se veut aucunement exhaustif.

Tableau 1. Quelques gènes modulés par l'acide rétinoïque

Gènes possédant un RARE	Référence
(h) ¹ RAR α 2	<i>Leroy et al. 1991</i>
(h) RAR β 2	<i>de Thé et al. 1990</i>
(h) RAR γ 2	<i>Lehmann et al. 1992</i>
(r) CRBP I	<i>Hushmann et al. 1992</i>
(m) CRABP II	<i>Durand et al. 1992</i>
(h) RBP	<i>Panariello et al. 1996</i>
(h) alcool déhydrogénase 3 (classe I)	<i>Duester et al. 1991</i>
(h) apolipoprotéine AI	<i>Rottmann et al. 1991</i>
(h) acyl CoA déhydrogénase de chaîne moyenne	<i>Raisher et al. 1992</i>
(h) gènes contenant une «homeobox» (<i>Hoxd-4</i>)	<i>Morrisson et al. 1996</i>
(h) ocytocine	<i>Richard et Zingg 1991</i>
(h) ostéocalcine	<i>Schüle et al. 1990</i>
(b) hormone de croissance	<i>Williams et al. 1992</i>
(m) laminine B1	<i>Vasios et al. 1992</i>
(b) kératine 6	<i>Navarro et al. 1995</i>
Gènes possédant un RXRE	Référence
(r) CRBP II	<i>Mangelsdorf et al. 1991</i>
(r) acyl CoA oxidase	<i>Kliwer et al. 1992</i>
(c) ovalbumine	<i>Kliwer et al. 1992</i>
(r) phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK)	<i>Lucas et al. 1992</i>
(m) complexe majeur d'histocompatibilité (classe I)	<i>Nagata et al. 1992</i>

¹ h: humain, r: rat, m: souris, b: bovin, c: poulet

2. Restriction alimentaire et vieillissement

2.1 Théories du vieillissement

Définir le vieillissement n'est certes pas chose simple, les gérontologues eux-mêmes ne s'entendent pas sur une définition unique. On prétend qu'il existe au moins autant de définitions que de théories du vieillissement et en 1990, Medvedev avait dénombré plus de trois cents de ces théories... De façon simpliste, on peut considérer le vieillissement comme une étape normale de la vie et ainsi le définir par la somme des changements qui surviennent chez un organisme avec le passage du temps. Certains voient plutôt le vieillissement comme un processus détérioratif et ajoutent à la première définition une involution morphologique et fonctionnelle des organes, tissus et cellules, menant à une incapacité généralisée et éventuellement, à la mort. D'autres considèrent enfin le vieillissement comme une série de dommages moléculaires et cellulaires qui conduisent à la perte progressive de l'homéostasie interne et affaiblissent le pouvoir de faire face au stress (*Timiras 1994*).

Quant aux théories du vieillissement, leur diversité dépend grandement de l'angle selon lequel on les aborde, c'est-à-dire, moléculaire, cellulaire ou systémique. Devant la pléthore d'hypothèses relatives à chacun de ces points de vue, il est tout de même possible d'englober les diverses théories en deux grandes catégories basées soit sur les facteurs intrinsèques qui réfèrent aux composantes génomiques et processus génétiques, soit sur les facteurs extrinsèques ou les influences environnementales sur l'organisme (*Aldeman 1982, Dice 1994*).

Le fait que chaque espèce animale ait une durée de vie à peu près fixe et qui lui est propre a fait naître l'idée d'une organisation génétique prédéterminée, d'où la «théorie de la programmation». Cette théorie stipule que le cours du vieillissement serait programmé dans le code génétique, au même titre que les phases de développement, de maturation et de reproduction (*Holliday 1992*). Elle s'inscrit dans un contexte évolutif plus large en tant que processus de sélection naturelle afin de contrôler

les populations. Cette vue est toutefois fortement contestée (*Rose et Service 1985*). Parmi les évènements inhérents à cette théorie plutôt moléculaire, mentionnons la restriction des codons ou l'incapacité de la cellule à décoder les codons de l'ARNm affectant ainsi la fidélité de la traduction (*Strehler 1977*), les mutations somatiques menant à la perte de gènes fonctionnels (*Failla 1960, Sacher 1977*), la théorie des erreurs dans la transmission de l'information de l'ADN entraînant la formation de protéines aberrantes (*Orgel 1963, Medvedev 1964*) et les changements dans l'expression de gènes modulant le développement et le vieillissement («gérontogènes») (*Kanungo 1975*). Une approche un peu plus moderne met l'emphase sur des traits à caractères antagonistes voulant que des gènes ayant des effets bénéfiques pendant la croissance et le développement exerceraient des effets délétères à un âge avancé. En résumé, si l'influence des gènes sur le cours du vieillissement est indéniable, aucune évidence ne supporte entièrement une programmation génétique (*Kowland et Kirkwood 1994*).

Certains facteurs intrinsèques se répercutent aussi aux niveaux cellulaire et systémique. Dans le premier cas, on retrouve l'accumulation de pigments du vieillissement, collectivement regroupés sous le nom de lipofuscine, chez divers types cellulaires. Les dépôts de lipofuscine ont été associés à une réduction de la masse cytoplasmique et du réticulum endoplasmique, ainsi qu'à une vacuolisation du cytoplasme. De plus, la perte de neurones observée avec l'avancement de l'âge est fortement corrélée à l'accumulation de lipofuscine au niveau du cortex et des hippocampes cérébraux, chez plusieurs espèces (*Sharma 1994*). Les théories immunologique et neuroendocrine représentent deux exemples de dégénérescence de systèmes, au cours du vieillissement. La première théorie suggère que le système immunitaire perd graduellement sa défense contre les antigènes et même, sa propre reconnaissance ce qui résulte en une plus forte incidence de maladies infectieuses et auto-immunes (*Walford 1969*). La seconde postule que les mécanismes de contrôles homéostatiques orchestrés par l'action combinée des systèmes neurologiques et endocriniens deviennent désorganisés avec le temps, faisant en sorte que l'organisme vieillissant ne peut plus s'ajuster aux changements ambiants (*Timiras 1983*).

L'explication globale du vieillissement réside peut-être dans l'influence exercée par les facteurs environnementaux sur les facteurs intrinsèques mentionnés. En effet, il a été démontré que l'expression des gènes pouvait être influencée par des conditions externes telles que les stress oxydatifs et la diète (*van Remmen et al. 1995, Yu 1995*). L'exposition à des radiations, des polluants, des bactéries et virus, des contaminants alimentaires représentent quelques exemples des attaques externes que l'organisme doit obligatoirement affronter, en plus des produits générés par le métabolisme oxydatif. Ces agressions peuvent entraîner l'accumulation de radicaux libres modifiant certains constituants cellulaires normaux telles que les structures cellulaires, incluant les membranes lipidiques et les protéines, les systèmes de défense menant à un déséquilibre redox et les systèmes de réparation et d'élimination. Il est postulé que l'ensemble de ces changements conduirait à la perte progressive de l'homéostasie qui serait directement reliée à l'apparition de pathologies et au vieillissement (*Yu 1996*). Finalement, en plus des systèmes de réparation, la mort cellulaire programmée par apoptose assure une protection supplémentaire à la cellule, en éliminant les cellules lourdement endommagées. Selon un modèle élaboré par Warner *et al.* (1995), le potentiel d'apoptose d'une population de cellules diminuerait avec l'âge, d'où la perte de la capacité d'éliminer les cellules sénescents, qu'elles soient endommagées ou non. Ces aspects seront plus longuement traités à la section 2.2.2.

2.2 Modulation nutritionnelle du vieillissement: modèle de restriction alimentaire

L'Homme a toujours cherché, la plupart du temps vainement, des moyens de prolonger la jeunesse et la vie. De toutes les tentatives exploitées, les gérontologues reconnaissent actuellement un seul moyen expérimental robuste et reproductible qui parvient à augmenter la durée de vie de plusieurs espèces; il s'agit de la restriction alimentaire. D'abord décrite chez le rat par McCay *et al.* (1935), la restriction de l'apport alimentaire a pour effet de ralentir le processus du vieillissement et de retarder l'apparition de pathologies normalement associées à l'avancement de l'âge. Ce modèle,

ayant fait ses preuves surtout chez le rat et la souris est maintenant utilisé par de nombreux chercheurs, chez diverses espèces animales, dont les primates, afin d'étudier les causes et les changements associés au vieillissement en l'absence de pathologies confondantes.

2.2.1 Description du modèle

Le modèle de restriction alimentaire présente des caractéristiques utiles: il est facile à appliquer, les résultats obtenus sont hautement reproductibles et présentent généralement peu de variabilité, et l'étendue de ses effets est très vaste, allant de changements moléculaires à systémiques.

2.2.1.1 Consommation alimentaire

Le modèle classiquement utilisé consiste en une réduction de 40%, en poids, de la quantité de diète consommée par des animaux qui mangent à volonté. Il s'agit donc d'une restriction énergétique provenant des trois macronutriments, protéines, glucides et lipides, toutes proportions gardées. Afin d'éviter tout risque de malnutrition, la diète est généralement enrichie en micronutriments de sorte à fournir un apport semblable à celui des animaux contrôles. La réduction de l'apport alimentaire résulte évidemment en un poids corporel plus faible équivalent à environ la moitié de celui des animaux contrôles, adultes. Cependant, il faut noter qu'à ce niveau de restriction, le poids des animaux continue d'augmenter tout au long de leur vie, mais à un rythme plus ralenti (*Weindruch 1996*). De façon générale, la restriction alimentaire est imposée dès le sevrage et maintenue pour le reste de la vie, mais d'autres approches testées se sont avérées efficaces. Effectivement, le fait de débiter la restriction alimentaire au début de la vie adulte, après la période de croissance et de puberté, a causé une augmentation significative de la durée de vie chez la souris, quoique l'effet n'était pas aussi important que dans le modèle de restriction implantée dès le sevrage (*Weindruch et Walford 1982, Cheney et al. 1983*). *Yu et al. (1985)* ont obtenu des résultats semblables chez des rats

restreints à partir de 6 mois d'âge. Cependant, une restriction alimentaire débutée à l'âge de 6 semaines et ensuite arrêtée à 6 mois n'a pas eu pour effet d'allonger la durée de vie totale des rats. Il semble donc que l'influence de la restriction alimentaire sur l'extension de la vie dépende davantage de la durée de la restriction que du moment de l'implantation.

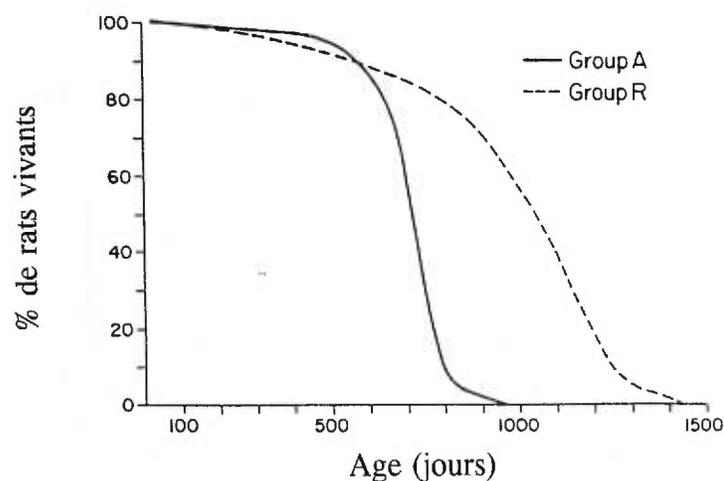
Une étude récente s'est penchée sur les différences dans la consommation alimentaire typique des rats nourris à volonté, c'est-à-dire, en plusieurs petits repas, par rapport aux rats en restriction, qui ne font qu'un seul repas dans la journée. Deux groupes de rats soumis à une restriction alimentaire de 40% ont reçu leur ration quotidienne en un ou plusieurs repas. Même si ces façons différentes de s'alimenter ont causé des changements dans les profils diurnaux de corticostérone et de glucose plasmatiques, elles ont toutes deux entraîné les mêmes effets bénéfiques sur la longévité et l'apparition de pathologies (*Masoro et al. 1995*).

Une autre considération d'intérêt, à savoir si les effets de la restriction alimentaire étaient attribuables à une composante de la diète en particulier, a fait l'objet de recherches. En l'absence de restriction énergétique, une diminution de l'apport protéique a pu prolonger la durée de vie, mais seulement de façon minime, chez des rats (*Masoro et al. 1989*). Après autopsie, cette prolongation a été attribuée à une faible incidence de néphropathie associée à l'âge. Dans une autre étude, la néphropathie causée par un excès protéique (32% de la diète) a pu être inhibée tant qu'une restriction alimentaire de 40% était appliquée (*Iwasaki et al. 1988a*). La contribution des lipides et des minéraux aux effets bénéfiques de la restriction alimentaire a aussi été étudiée. *Iwasaki et al. (1988b)* ont démontré qu'une réduction de 10% à 6% de ces composantes de la diète n'a pas produit les effets escomptés. Bien qu'il soit parfois difficile de discerner la part des lipides au total des calories, tout porte à croire que la réduction de l'énergie totale soit responsable des effets bénéfiques sur la longévité et les pathologies associées.

2.2.1.2 Effets sur la longévité et les pathologies associées au vieillissement

On ne saurait évaluer la longévité uniquement par l'espérance de vie d'une population. En effet, l'espérance de vie inclut des paramètres autres que le vieillissement, comme les morts précoces dues aux maladies infectieuses ou aux conditions hygiéniques inadéquates. C'est pourquoi les gérontologues préfèrent utiliser les notions de durée de vie moyenne et maximale, cette dernière référant à la durée de vie de l'individu le plus vieux d'un groupe donné (*Timiras 1994*). En plus de l'espérance de vie, ces deux paramètres sont favorablement affectés par la restriction alimentaire. Les premières études de McCay (*1935*) ont rapporté des augmentations de la durée moyenne de vie de 933 à 1323 jours pour les rats mâles et de 1117 à 1456 jours pour les femelles soumis à une restriction alimentaire de 40%. Ces observations ont été maintes fois vérifiées depuis et l'on chiffre grossièrement à 50% l'augmentation de la durée de vie moyenne par la restriction alimentaire (*Masoro 1996*). Ces effets sur la longévité sont souvent représentés par des courbes illustrant le pourcentage de survivants des groupes comparés, comme celles données en exemple ci-bas. En se fiant à ces courbes, on peut apprécier qu'au moment où tous les rats du groupe contrôle sont décédés, environ 70% des rats soumis à la restriction alimentaire sont toujours en vie. L'ensemble de ces observations suggère que cette stratégie nutritionnelle agit sur la longévité en ralentissant le processus de vieillissement.

Figure 8. Courbes de survie de rats soumis à la restriction alimentaire



(tiré de *Masoro 1991*)

Une part de l'effet observé sur la longévité des animaux soumis à la restriction alimentaire vient du fait que cette stratégie nutritionnelle empêche et/ou retarde certaines pathologies qui augmentent normalement en fréquence avec l'âge. La néoplasie et la néphropathie représentent les deux pathologies les plus souvent rencontrées chez les rongeurs et dont l'incidence est réduite par la restriction alimentaire (*Masoro 1988*). Cette intervention nutritionnelle exerce deux effets majeurs sur la carcinogénèse, soit qu'elle empêche carrément le développement de tumeurs, soit qu'elle ralentit leur progression. Ainsi, sous l'action de la restriction alimentaire, le développement de leucémie (*Higami et al. 1994*), de tumeurs testiculaires, pancréatiques (*Higami et al. 1995*), prostatiques et hépatiques (*Pollard et al. 1989*) est retardé. Dans certains cas, notamment pour les adénomes hypophysaires (*Higami et al. 1995*) et les tumeurs mammaires (*Kritchevsky et al. 1989*), elle exerce les deux effets à la fois. Ces effets sont vérifiables pour des tumeurs spontanées, induites chimiquement ou par exposition à des radiations (*Tannenbaum et Silverstone 1953, Gross et Dreyfuss 1990*). Bien que la part lipidique de la diète semble exercer une certaine influence dans le développement de tumeurs, c'est la restriction énergétique totale qui tient le rôle prépondérant (*Tannenbaum 1945, Iwasaki et al. 1988b*). Finalement, l'incidence tumorale semble dépendre du degré de restriction alimentaire, du moins pour les tumeurs mammaires induites chimiquement (*Chevalier et al. 1993*).

L'avancement de l'âge est généralement accompagné de néphropathie résultant en une insuffisance rénale, chez le rat et particulièrement, le rat mâle Fisher 344 (*Maeda et al. 1985*). Grâce à un système de gradation de la sévérité des lésions rénales élaboré par Yu *et al.* (1982), plusieurs chercheurs ont démontré que la restriction alimentaire diminuait l'incidence de rats porteurs de lésions sévères et augmentait l'incidence de rats ne présentant aucune lésion (*Maeda et al. 1985, Masoro et al. 1989*). De plus, ces auteurs ont établi que l'effet bénéfique de la restriction alimentaire dépendait davantage de la restriction en énergie qu'en protéines. Cette propriété de retarder ou d'empêcher le développement de pathologies rénales fait de la restriction alimentaire un modèle

particulièrement choisi pour étudier le métabolisme des rétinoïdes. Effectivement, les pathologies rénales fréquentes associées au vieillissement constitueraient un facteur confondant dans nos études, puisque le rein est activement impliqué dans la régulation de la rétinolémie. Il est donc possible, par la restriction alimentaire, de contourner ce problème.

Les rats génétiquement hypertendus constituent un bon modèle pour étudier l'hypertension essentielle ou idiopathique chez l'humain, puisqu'elle survient spontanément, augmente en sévérité avec l'âge, touche davantage les mâles et entraîne de nombreuses complications au niveau du coeur, des reins et du cerveau (*Merry et Holehan 1994*). Il a été démontré que la restriction alimentaire augmentait la durée de vie moyenne et maximale des rats hypertendus tout comme celle des normotendus et cette augmentation était accompagnée d'une réduction de la fréquence des lésions typiques de l'hypertension. De façon paradoxale, il semble que la restriction alimentaire ait pu assurer une protection contre les lésions dues à l'hypertension, sans toutefois diminuer la pression sanguine, chez ces animaux (*Lloyd et Boyd 1981, Lloyd 1984*).

En plus des pathologies mentionnées, la restriction alimentaire a pour effet de contrecarrer plusieurs changements biologiques, soit une hausse ou une baisse, normalement associés au vieillissement. Cette intervention nutritionnelle agit en maintenant la plupart des paramètres à un niveau normal, équivalent à celui de la vie adulte. Le tableau suivant présente quelques exemples de ces paramètres.

Tableau 2. Modulation par la restriction alimentaire de quelques modifications biologiques reliées à l'âge

Composantes sériques	Système immunitaire
Glucose	Réponse des cellules T
Insuline	Production d'interleukine-2
Triglycérides et phospholipides	Involution du thymus
Cholestérol total	Prolifération des lymphocytes
Glucocorticoïdes	
Progestérone	Etat oxidatif
Prolactine	Production de radicaux libres
Testostérone	Enzymes anti-oxidantes
Calcium total	Acide ascorbique
Fer total	Glutathion
Ferritine	Vitamine E
	Péroxidation des lipides
Fonctions cellulaires	Domage et réparation de l'ADN
Structure membranaire	
Synthèse et dégradation protéique	Autres
Transcription et traduction	Perte osseuse
Expression des gènes	Fonctions mitochondriales
	Activités locomotrices
Système reproductif	Détérioration neuronale
Cycle ovulatoire	Activité lipolytique
Déplétion folliculaire	

(adapté de Yu 1996)

2.2.2 Mécanismes d'actions proposés

Avant d'aborder les hypothèses actuelles du ralentissement du vieillissement par la restriction alimentaire, mentionnons trois hypothèses longuement véhiculées dans la littérature, mais ayant été réfutées depuis: il s'agit de la théorie du retard de croissance, de l'adiposité et du taux métabolique. La première théorie présume que le taux de croissance est directement relié à celui du vieillissement et parallèlement, si la croissance est ralentie, la durée de vie sera augmentée (McCay *et al.* 1935). Les études

où la restriction est débutée à l'âge adulte, après la période de croissance, ont infirmé cette vue, puisque les effets sur la longévité et le développement de pathologies se sont avérés sensiblement les mêmes que dans le modèle classique de restriction débutée suite au sevrage (voir la section 2.2.1.1).

La théorie de l'adiposité repose sur la prémisse de l'obésité en tant que facteur de risque de plusieurs pathologies, donc de mort précoce, et inversement, la restriction alimentaire, en diminuant le pourcentage de masse adipeuse augmenterait la durée de vie (*Berg et Simms 1960*). Les animaux soumis à la restriction sont évidemment moins gras et vivent plus longtemps que leurs contrôles nourris à volonté. Cependant aucune corrélation n'a pu être établie entre la masse adipeuse et la durée de vie au sein-même du groupe contrôle, chez des rats Fisher 344 (*Bertrand et al. 1980*) et Wistar (*Stuchliková et al. 1975*). De plus, la restriction alimentaire a entraîné une augmentation de la vie de souris génétiquement obèses (*ob/ob*) par rapport à celle de souris nourries à volonté, bien qu'elles soient plus grasses que ces dernières (*Harrison et al. 1984*).

En 1977, Sacher propose qu'une réduction du taux métabolique expliquerait l'effet de la restriction alimentaire sur le ralentissement du vieillissement. Cette hypothèse s'appuyait sur trois observations majeures: d'abord, la croyance que le vieillissement est inversement relié au taux métabolique (*Masoro 1985*), que le métabolisme de base diminue lors d'apport alimentaire réduit, chez l'humain (*Garrow 1974*) et enfin, qu'une diminution du taux métabolique réduit la génération de radicaux libres probablement impliqués dans le processus de vieillissement (*Harman 1981*). Par contre, il a été calculé que l'apport énergétique, exprimé par unité de masse maigre, est identique chez les rats soumis à la restriction alimentaire que chez les contrôles (*Masoro et al. 1982*). Suggérant encore plus fortement un maintien du taux métabolique pendant la restriction, McCarter et Palmer (*1992*) ont trouvé que les rats F344 en restriction ou nourris à volonté consommaient la même quantité d'oxygène par unité de masse maigre. Ces résultats supposent qu'on ne puisse attribuer l'augmentation de la durée de vie par la

restriction alimentaire à une réduction du métabolisme de base. Les mécanismes d'actions suivants font encore l'objet de recherche. Bien qu'ils soient présentés séparément, il est à envisager que ces mécanismes présentent des interactions entre eux.

2.2.2.1 Expression des gènes, réparation de l'ADN, turnover protéique et apoptose

Au cours de la dernière décennie, de nombreux groupes de chercheurs ont rapporté des effets moléculaires de la restriction alimentaire et particulièrement, la modulation de l'expression de divers gènes, avec le vieillissement. Ces gènes codent pour des protéines fonctionnelles ou structurales, impliquées dans des processus biologiques très variés. Parmi ces protéines, on retrouve l' α_{2u} -globuline, dont les taux d'ARNm et de transcription sont de 2 à 3 fois plus élevés chez les rats F344 âgés en restriction que chez leurs contrôles (*Richardson et al. 1987*). L'expression de plusieurs enzymes anti-oxydantes a aussi été étudiée. Ainsi, une augmentation significative dans les taux d'ARNm et l'activité de la superoxyde dismutase, de la catalase et de la glutathion peroxydase hépatiques a été observée chez des rats soumis à la restriction alimentaire (*Rao et al. 1990, Semsei et al. 1987*). De plus, la restriction alimentaire a pu contrecarrer la diminution sénile de l'expression des cytochromes P₁- et P₄₅₀, impliqués dans la détoxification des xénobiotiques (*Mote et al. 1991*). Heydari *et al.* (1995) ont rapporté une induction supérieure de l'ARNm des protéines de choc thermique, hsp70 et ubiquitine, dans des hépatocytes isolés de rats âgés en restriction, probablement en vue de protéger les cellules des effets toxiques de divers stress, bien que le niveau basal de ces protéines était identique à celui des rats nourris à volonté. La restriction alimentaire a parfois pour effet d'inhiber l'expression de certains gènes. Ainsi, les taux d'ARNm de la fibronectine, une protéine de la matrice extracellulaire, tendent à augmenter dans le cerveau et le foie des rats vieillissants tandis que la restriction a eu pour effet de diminuer ces taux d'environ 5 fois (*Dorner et al. 1995*). Aussi, les taux protéiques et d'ARNm de la protéine 78 contrôlée par le glucose (GRP78) sont réduits significativement par la restriction alimentaire. Comme cette

protéine agit en tant que chaperon dans la sécrétion hépatique de plusieurs protéines, sa modulation par la restriction alimentaire pourrait signifier des répercussions plus larges (*Tillman et al. 1996*).

Comme pour plusieurs autres paramètres, la restriction alimentaire retarde le déclin dans la réparation de l'ADN, normalement observé avec le vieillissement (*Weraarchakul et al. 1989*), possiblement en maintenant la fidélité des polymérase de l'ADN, tel que démontré dans des foies de souris (*Srivastava et Busbee 1992*). Plusieurs auteurs ont rapporté une augmentation de la synthèse protéique hépatique en conditions de restriction alimentaire (*Birchenall-Sparks et al. 1985, Ward 1988, Ferland et al. 1992a*). Cette synthèse protéique accrue a été couplée à une augmentation de la dégradation protéique, accélérant ainsi le turnover des protéines, chez les rats soumis à la restriction (*Ward et Richardson 1991*). A la lumière de ces observations, il est postulé que les animaux soumis à la restriction alimentaire seraient à même d'éviter la formation de protéines aberrantes due à des défauts génétiques, et d'en éviter l'accumulation qui pourrait conduire à une perte des fonctions cellulaires.

Dans le même sens, une vue relativement nouvelle est apportée par le lien entre la restriction alimentaire et la mort cellulaire programmée ou l'apoptose. James et Muskhelishvili (*1994*) ont en effet postulé qu'une augmentation de la mort des cellules apoptotiques avec la restriction alimentaire pourrait contribuer à la résistance au développement de pathologies et à la prolongation de la durée de vie, en assurant une sélection naturelle au niveau cellulaire. La régulation de l'apoptose par cette approche nutritionnelle a d'abord été observée dans des modèles de carcinogénèse spontanée. Ainsi, la réduction de l'apport alimentaire chez des rats a conduit à une augmentation de l'apoptose et ce, préférentiellement dans les cellules prénéoplasiques de foie. Environ 85% de ces cellules ont été éliminées par rapport à 15-20% des cellules hépatiques normales (*Grasl-Kraupp et al. 1994*). La restriction alimentaire exercerait son effet à deux niveaux, soit en réduisant le cycle et la prolifération cellulaire tout en augmentant la mort cellulaire. Le modèle de Warner *et al. (1995)* intègre, outre les

cellules prénéoplasiques, les cellules endommagées par les produits d'oxydation de même que les cellules sénescents comme cibles de l'apoptose, telle que modulée par la restriction alimentaire.

2.2.2.2 Réponse immune

La théorie de l'amélioration de la réponse immune grâce à la restriction alimentaire s'appuie sur les modifications associées à l'âge, au niveau de ce système qui figurent au tableau 2. En ce sens, le déclin sénile de l'immunité est retardé chez les animaux en restriction, tandis que les pathologies auto-immunes sont carrément évitées, même chez certaines souches de souris génétiquement prédisposées (*Fernandes 1991*). Les tenants de cette hypothèse soutiennent que le maintien d'un système immunitaire compétent protégerait contre le développement de pathologies et en particulier, de néoplasie en empêchant l'activation des oncogènes (*Weissman et al. 1986, Iwai et Fernandes 1989*). Ce maintien de l'immunité par la restriction alimentaire survient probablement via une régulation des gènes associés, rejoignant ainsi les aspects discutés à la section 2.2.2.1. De plus, plusieurs composantes de l'immunité, dont l'involution thymique, la maturation des cellules T, et l'activité des cellules suppresses, sont sous contrôle hormonal, sujet traité dans la prochaine section.

2.2.2.3 Théorie neuro-endocrine

Etant donné l'étendue des actions de la restriction alimentaire, une théorie englobant les systèmes nerveux et endocriniens a été élaborée. Elle propose qu'un apport alimentaire réduit stimule le centre nerveux de régulation (l'hypothalamus) qui enverra des messages efférents nerveux ou humoraux aux organes et glandes cibles de sorte à enclencher des événements moléculaires opposés au vieillissement (*Masoro 1991*). A ce jour, l'axe hypothalamo-hypophyso-adrénocortical, par sa modulation des glucocorticoïdes, apporte certaines preuves en ce sens, puisqu'il permet de faire face à divers stress (*Munck et al. 1984*) et qu'il semble sous l'influence de la restriction

alimentaire. En effet, Sabatino *et al.* (1991) ont étudié le profil diurnal des concentrations de corticostérone plasmatique, chez des rats F344 en restriction en comparaison à des rats nourris à volonté. Ils ont trouvé que le pic de sécrétion de corticostérone libre survenant l'après-midi était de 2 à 8 fois supérieur chez les rats en restriction, de façon constante au cours de leur vie. Cet hypercorticisme périodique modéré a été appuyé par des taux plasmatiques et hypophysaires réduits d'ACTH, témoignant une rétroaction négative par la corticostérone (Han *et al.* 1995). Il est donc possible qu'un stress d'intensité modérée appliqué à long terme procure une meilleure adaptation aux conditions externes et puisse prolonger la vie (Masoro *et Austad* 1996). Diverses conditions où un tel stress a été imposé permettent de le croire. Par exemple, des souris exposées à des chocs électriques quotidiens ou à de basses températures (Ordy *et al.* 1967) et des rats immergés dans l'eau froide pour quelques heures par jour ont vécu plus longtemps que les animaux non-traités de la sorte (Holloszy *et Smith* 1986). Dans le même optique, plusieurs observations suggèrent que des animaux soumis à la restriction alimentaire supportent mieux certains stress, tels que l'implantation d'une cannule jugulaire (Masoro 1994), l'injection de carragénine provoquant une réponse inflammatoire (Klebanov *et al.* 1995), une augmentation de la température ambiante (Heydari *et a.* 1993) et l'effet toxique de xénobiotiques (Duffy *et al.* 1995). Malheureusement, dans ces études, les taux de corticoïdes n'ont pas été mesurés ni mis en relation avec l'intensité du stress ou la restriction alimentaire. Mais, Schwartz *et Pashko* (1994) attribuent des effets aussi importants que variés à l'élévation des corticoïdes plasmatiques par la restriction alimentaire. Effectivement, ils soulignent qu'une autre hormone sécrétée en importantes quantités par le cortex surrénalien, la dehydroepiandrosterone (DHEA) présente une action anti-proliférative pouvant contribuer à la prévention de la carcinogénèse et de l'athérosclérose (Garcea *et al.* 1988, Shantz *et al.* 1989, Pashko *et al.* 1991) et proposent que les glucocortocoides, par leur propriété anti-inflammatoire, pourraient diminuer la formation de radicaux libres. Ceci démontre l'étendue possible des actions des corticoïdes tels que modulés par la restriction alimentaire.

2.2.2.4 Production de radicaux libres et détoxification

De toutes les théories du vieillissement testées à l'aide du modèle de restriction alimentaire, non seulement cette dernière n'a pas été réfutée mais elle reçoit de plus en plus de support. Il s'agit de la diminution de la production de radicaux libres parallèle à une amélioration des systèmes anti-oxydants par la restriction alimentaire (Yu 1996). Pour fins de compréhension, le terme radicaux libres englobe les molécules dérivées de l'oxygène, de l'azote ainsi que des molécules aldéhydiques dérivées de la peroxydation des lipides, générées obligatoirement par toute cellule qui respire. Il est postulé que ces molécules hautement réactives s'attaqueraient à plusieurs composantes structurales et fonctionnelles des cellules entraînant la perte de l'homéostasie globale et participeraient ainsi au processus de vieillissement (Yu et Yang 1996). Plusieurs études ont rapporté des effets marqués de la restriction alimentaire sur la génération de radicaux libres, par exemple, des quantités réduites de lipofuscine et de malondialdéhyde dans le cerveau de souris (Chipalkatti et al. 1983), une diminution de la peroxydation des lipides mesurée dans des foies de souris (Koizumi et al, 1987), ainsi que de la production de H₂O₂ dans le cerveau, le coeur et le rein (Sohal et al. 1994). D'autres auteurs ont étudié plus particulièrement les effets délétères de l'âge sur la structure membranaire et rapportent que la restriction alimentaire atténue la peroxydation des lipides des membranes mitochondriales et microsomaux (Laganière et Yu 1987, 1989a). Cette protection s'effectue par une modulation des acides gras, en augmentant le ratio de saturation/insaturation, réduisant ainsi la susceptibilité de la membrane à la peroxydation. Ces changements ont lieu tout en contrecarrant l'augmentation de la rigidité membranaire associée au vieillissement, de sorte à maintenir la fluidité des membranes comparable à celle de jeunes rats (Yu et al. 1992).

Les défenses anti-oxydantes ont aussi fait l'objet de recherche. Koizumi et al. (1987) ont montré un effet potentialisateur de la restriction alimentaire sur l'activité de la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase et de façon plus marquée, la catalase hépatique de souris âgées. Il semble toutefois que l'expression des gènes de ces deux

dernières enzymes ne soient pas modulées par la DR, chez les souris (Tillman et al. 1996). Chez des rats F344 soumis à la restriction alimentaire, Laganier et Yu (1989b) ont observé une modulation de l'activité de la catalase, des glutathion réductase, peroxydase et transférase de même que des taux de glutathion et d'acide ascorbique. De façon inattendue, les rats nourris à volonté présentaient des taux membranaires et sériques de vitamine E supérieurs à ceux des rats restreints. Les auteurs expliquent cette observation par la possibilité que les taux de vitamine E soient reliés à l'état oxydatif et à la quantité de lipides membranaires, supérieurs chez les rats âgés nourris à volonté. Les actions de la restriction alimentaire sur l'état oxydatif résident probablement dans un équilibre entre la formation de radicaux libres et un contrôle au niveau de la régulation des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la défense anti-oxydante, tel que déjà discuté à la section 2.2.2.1.

2.3 Influence du vieillissement et de la restriction alimentaire sur le métabolisme des rétinoïdes

2.3.1 Absorption intestinale

En parcourant la littérature, plutôt mince, sur ce sujet, on s'aperçoit qu'il est généralement assumé que l'absorption de la vitamine A est augmentée avec l'avancement de l'âge (*Hollander 1981, Russell et Suter 1993*). Pourtant, les études publiées rapportent des résultats contradictoires. Ainsi, Hollander et Morgan, (1979) ont observé une augmentation linéaire de l'absorption de la vitamine A allant de 25 % de la dose perfusée dans l'intestin de rats âgés de 1.5 mois, comparativement à 37 % pour des rats de 39 mois. Ces auteurs ont postulé que l'absorption plus efficace de la vitamine A avec l'âge contribuerait à une accumulation hépatique des rétinoïdes. Ce même groupe de chercheurs n'a toutefois pas trouvé d'effet du vieillissement sur l'absorption du rétinol, chez des souris, (*Hollander et al. 1986*) rejoignant de ce fait les observations de Fleming et Barrows (1982) effectuées chez le rat. Dans tous ces travaux, le taux d'absorption de la vitamine A a été estimé par sa disparition du perfusé, méthode qui ne considère pas le métabolisme intestinal et le transport lymphatique subséquents. Conséquemment, le transport direct de la vitamine A dans la circulation lymphatique a été mesuré chez des rats mâles Sprague-Dawley de divers âges et s'est avéré augmenté de façon croissante avec l'âge, par unité de temps (*Hollander et Dadufalza 1991*). Il est d'intérêt de souligner que le poids corporel des animaux, croissant avec l'âge, n'a pas été considéré dans l'expression des résultats et qu'en fait, le taux d'absorption serait plutôt réduit, s'il était exprimé par unité de poids corporel, chez les rats adultes et âgés par rapport aux plus jeunes.

L'absorption de la vitamine A a également été étudiée chez l'humain par la réponse post-prandiale des rétinyl esters plasmatiques suite à l'ingestion d'une dose élevée de rétinyl palmitate (3000 équivalents de rétinol, correspondant à trois fois la dose journalière recommandée). Cette réponse était fortement liée à l'âge, se traduisant par

des taux plasmatiques de rétinyl esters significativement plus élevés chez les sujets plus âgés, tels qu'évalués par le pic et la surface sous la courbe en fonction du temps (*Krasinski et al. 1990*). Les auteurs ont cependant démontré que cette réponse était expliquée par une diminution dans la clairance des rétinyl esters des chylomicrons par les gens âgés, plutôt que par une augmentation de l'absorption intestinale de la vitamine A.

La seule étude concernant l'effet de la restriction alimentaire sur l'absorption de la vitamine A rapporte une augmentation significative, autant chez des souris âgées de 6 mois que celles âgées de 26 mois, par opposition à leurs contrôles du même âge nourries à volonté (*Hollander et al. 1986*). Les auteurs expliquent l'absorption augmentée de vitamine A par des changements, dûs à la restriction alimentaire, dans les caractéristiques de la couche d'eau stationnaire adjacente à la membrane intestinale et qui constitue une barrière au passage des molécules hydrophobes (*Thompson 1981*).

2.3.2 Entreposage hépatique

Avec l'avancement de l'âge, on observe une accumulation des rétinoïdes au niveau du foie chez les rongeurs (*Guerrant 1949, Sundboom et Olson 1984, Hendriks et al. 1987, Ferland et al. 1992b, Sweda 1994*). Les quelques données disponibles chez l'humain sont plus contradictoires, une étude faisant état d'une augmentation (*Underwood 1970*), tandis qu'une autre ne note aucun effet de l'âge sur le contenu hépatique en rétinoïdes (*Black et al. 1988*). Les causes et conséquences de cette accumulation ne sont pas élucidées, mais certains croient à l'augmentation de l'absorption intestinale comme facteur causal, malgré la controverse discutée à la section précédente (*Hollander et Dadufalza 1990*). En accord avec les résultats rapportés chez la souris (*Sundboom et Olson 1984*), les rats âgés entreposent la vitamine A surtout sous forme de rétinyl palmitate (*Ferland et al. 1992b, Sweda 1994*). *Ferland et al. (1992b)* ont, de plus, démontré une corrélation entre l'augmentation des concentrations hépatiques de rétinoïdes et le nombre ainsi que le volume des cellules

étoilées. Par ailleurs, le rétinyl palmitate a été identifié comme un des pigments fluorophores majeurs de la lipofuscine ou pigment du vieillissement, dont les taux hépatiques croissent avec l'âge (*Sweda 1994*). *Hendriks et al. (1987)* ont plus spécifiquement décrit les effets du vieillissement sur la distribution cellulaire des rétinoïdes hépatiques de même que plusieurs paramètres reliés à leur métabolisme tels que les taux de RBP, CRBP, CRABP, TTR et l'activité de la rétinyl ester hydrolase (dépendante des acides biliaires) en comparaison avec celle de la cholestéryl oleate hydrolase. Outre l'augmentation des rétinoïdes dans les cellules parenchymateuses et surtout, dans les cellules étoilées, ces auteurs n'ont noté de différence ni dans la distribution cellulaire des rétinoïdes, ni dans aucun autre paramètre évalué, entre l'âge de 6 à 36 mois, chez des rats femelles BN/BiRij et concluent à un maintien de l'homéostasie hépatique des rétinoïdes avec le vieillissement.

Dans l'unique étude publiée sur le contenu hépatique en rétinoïdes de rats soumis à la restriction alimentaire, *Ferland et al. (1992b)* ont démontré une augmentation encore plus marquée que celle observée avec le vieillissement, de pair avec une augmentation de l'index de cellules étoilées. Ces auteurs attribuent potentiellement ces observations à une meilleure absorption intestinale de la vitamine, secondaire à un débit biliaire et à une sécrétion d'acides biliaires augmentés chez les rats soumis à la restriction (*Tuchweber et al. 1987, Ferland et al. 1989*).

2.3.3 Niveaux sanguins

La plupart des études nationales d'envergure rapportent, pour la population âgée, des taux sanguins de rétinol adéquats, ne plaçant pas ces gens à risque de déficience (*Comstock et al. 1988, Woo et al. 1988, Kivelä et al. 1989, Saito et Itoh 1991, de Groot et al. 1992, Sahyoun 1992*). Bien que *Garry et al. (1987)* aient démontré une tendance vers l'augmentation des valeurs de rétinol sérique chez les gens âgés, plusieurs autres chercheurs n'ont observé aucun effet de l'âge sur la rétinolémie (*Comstock et al. 1988, Kivelä et al. 1989, Krasinski et al. 1989, Succari et al. 1991*). Cependant, une

élévation plus importante des taux sanguins de rétinyl esters, à jeûn, a été notée chez les personnes âgées utilisatrices de suppléments par rapport aux jeunes utilisateurs (*Krasinski et al. 1989*). Sans atteindre toutefois des niveaux reflétant l'hypervitaminose A, les taux de rétinyl esters des utilisateurs à long terme (plus de 5 ans) de suppléments étaient associés à des tests biochimiques témoignant d'un dommage hépatique, ne pouvant être expliqué par la médication.

3. But de la présente étude

Devant l'étendue des actions de la restriction alimentaire sur divers systèmes biologiques, il est envisageable que le métabolisme des rétinoïdes soit aussi influencé par cette intervention nutritionnelle. Par leur implication dans des fonctions physiologiques aussi variées qu'essentiels, les rétinoïdes offrent une avenue de recherche fort prometteuse. Quoiqu'il soit encore prématuré de relier les effets bénéfiques de la restriction alimentaire sur le vieillissement et les pathologies à un meilleur contrôle du métabolisme des rétinoïdes, une description de ce métabolisme tel qu'influencé par la restriction s'avère opportun. La littérature, peu abondante sur ce sujet, offre certaines preuves d'une telle influence, par exemple, les taux hépatiques de rétinoïdes supérieurs chez les rats âgés soumis à la restriction à ceux des rats nourris à volonté (*Ferland et al. 1992*) de même que l'augmentation de l'absorption intestinale de la vitamine chez des souris en restriction (*Hollander et al. 1986*). De plus, des études préliminaires ont démontré un effet significatif de la restriction sur les taux sanguins de rétinol, chez des rats adultes. Ces taux étaient effectivement diminués de façon proportionnelle avec des degrés croissants de restriction alimentaire, allant de 10% à 40% (*Chevalier et al. 1993*). Une pareille perturbation de la rétinolémie, normalement bien contrôlée, laisse donc présager une modulation de plusieurs aspects du métabolisme des rétinoïdes par la restriction alimentaire.

Dans ce contexte, la présente thèse vise à étudier quelques-uns de ces aspects soient, l'absorption intestinale, l'entreposage hépatique et le transport plasmatique des rétinoïdes, à l'aide du modèle de restriction alimentaire, au cours du vieillissement. La souche de rats femelles Sprague-Dawley a été choisie afin d'assurer une continuité avec les travaux précédents effectués par notre laboratoire. En substance, ce travail décrit une nouvelle action métabolique de la restriction alimentaire mais surtout, grâce à cette simple intervention nutritionnelle, il apporte des vues originales du métabolisme des rétinoïdes.

CHAPITRE 2. ARTICLE I

«Vitamin A status in rats submitted to graded levels of dietary restriction»

Stéphanie Chevalier, Beatriz Tuchweber, Roger Vranckx,
Pangala V. Bhat et André Lacroix

Nutrition Research **15**:859-867, 1995.

AVANT-PROPOS I

Cet article décrit les effets de la restriction alimentaire sur l'état nutritionnel en vitamine A, chez des rats adultes, dans le but d'évaluer si les modifications rapportées dans la littérature existante chez des rats âgés se voyaient aussi suite à une restriction alimentaire à plus court terme. Pour ce faire, les taux de rétinol plasmatique, les réserves hépatiques de même que les concentrations en rétinoïdes de certains tissus périphériques ont été mesurés. Additionnellement, les taux plasmatiques de TTR, protéine impliquée dans le transport sanguin du rétinol, ont été déterminés.

Dans cette étude, des rats femelles Sprague-Dawley ont été soumis à quatre degrés de restriction alimentaire, soit de 10%, 20%, 30% et 40% de moins que la consommation alimentaire des rats contrôles nourris à volonté, afin de vérifier un effet graduel possible. La même diète était consommée par les différents groupes expérimentaux, à l'exception d'un enrichissement en vitamines et minéraux de la diète destinée aux rats en restriction, de telle sorte que l'apport quotidien en vitamine A soit égal pour tous. La restriction était débutée vers l'âge de 50 jours et maintenue pendant 30 semaines ou jusqu'à l'âge de 8-9 mois, moment auquel les prélèvements tissulaires ont été effectués.

**VITAMIN A STATUS IN RATS SUBMITTED TO GRADED LEVELS
OF DIETARY RESTRICTION**

**Stéphanie Chevalier M.Sc.¹, Beatriz Tuchweber Ph.D.^{1*}, Roger Vranckx Ph.D.²,
Pangala V. Bhat Ph.D.³ and André Lacroix M.D.³**

¹ Département de Nutrition, Université de Montréal, Montréal (Québec) Canada

² INSERM U224, Faculté de Médecine Xavier-Bichat, Paris, France

³ Centre de Recherche, Hotel-Dieu de Montréal, Montréal (Québec) Canada

* Corresponding author : Beatriz Tuchweber, Université de Montréal, C.P. 6128,
succ. centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

ABSTRACT

Studies on aging mice have shown that dietary restriction (DR) may influence retinoid absorption (1) and recent investigations from our laboratory demonstrated increased tissue levels of retinoids in old rats submitted to DR (2). To better understand the effect of DR on retinoid metabolism we measured retinoid content by HPLC in plasma, liver, kidney, lungs, intestine, adipose tissue and mammary glands of 8 months old-rats submitted to diets providing 10, 20, 30 and 40% less energy than ad libitum-fed rats. We observed a significant decrease in plasma retinol levels proportional to the degree of DR while liver concentrations of total retinoids remained unchanged. However, the ratio of retinol/retinyl esters (RE) was significantly higher in liver of DR groups. The distribution of various RE in the liver was found to be significantly altered between the control and the DR groups. Kidney retinoid levels were slightly but significantly decreased while lungs retinoid levels were markedly reduced in DR rats. Retinoid concentrations in intestine, adipose tissue and mammary glands were not influenced by DR. Plasma TTR levels measured at the end of the study were not modified in DR rats. These results demonstrate that DR alters retinoid metabolism in 8 months-old rats but do not increase liver content of vitamin A at this age. The fact that plasma retinol was decreased despite normal concentrations in liver suggests that RBP synthesis or release from the liver may be altered.

KEY WORDS: Vitamin A, Retinoids, Dietary Restriction, Food Restriction, Rats

INTRODUCTION

Dietary restriction (DR) is recognized to retard the aging process in laboratory rodents. Extension of life span and life expectancy, delay or prevention of age-related diseases and influence on many biological functions are well documented effects of DR (3).

In rats and humans, vitamin A (retinoids) stores increase with age (4,5). Studies in our laboratory showed that rats submitted to long term DR have greater hepatic retinoid concentrations than ad libitum-fed rats (2). Moreover, Hollander et al.(1) demonstrated that DR may increase retinoid absorption in mice.

The present study was conducted to further investigate the effects of DR on retinoid metabolism. To this aim, we measured retinoid levels in plasma, liver and several peripheral organs of rats with free access to food (ad libitum) or dietary restricted. Plasma transthyretin (TTR) levels were also measured since this thyroxin-binding protein is implicated in the transport of retinol as it complexes with the specific retinol carrier, retinol binding protein (RBP) (6).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female Sprague-Dawley rats, purchased from Charles River Canada Inc.(St-Constant, Québec, Canada) at 45 days of age, were housed in individual cages in a temperature-controlled room (22⁰C) under a 12 hour light/dark cycle. The animals were weighed weekly and food intake was recorded biweekly. This protocol was approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Diets

At their arrival, the rats were fed a semi-purified diet (Teklad Test Diets, Madison, WI) for 5 days during which individual food intake was recorded. They were then randomly assigned to one of the dietary groups: AD LIB: control group, with free access to food (n=10), DR10%, DR20%, DR30%, and DR40%: diet restricted groups, fed 90%, 80%, 70%, and 60% respectively of the mean amount of food, by weight, consumed by the controls (n=5/group). The composition of the control diet has been described elsewhere (7). The diets given to the restricted rats was the same as the control except for enrichment with vitamins and minerals to provide all the groups with the same daily intakes of vitamin A. Intakes were thus 107 ug retinol (375 pmol) as retinyl palmitate per day for control and DR groups. DR lasted for 30 weeks.

Autopsies

The animals were fasted for 15-18 hours prior to autopsies in order to prevent any variation in post-prandial nutrient absorption. Exsanguination by the abdominal aorta was performed under ether anesthesia. Blood was collected in heparinized tubes and plasma was immediately separated by a 10 minutes centrifugation at $500 \times g$. Livers, kidneys, lungs, intestines (post-pylorus to rectum), portions of retroperitoneal adipose tissue and mammary glands were harvested, washed in 0.9% saline solution, weighed and immediately frozen at -70°C , until retinoid analysis.

Determination of plasma and tissue retinoids

The extractions and chromatographic procedures were carried out under yellow fluorescent lights. Retinoids were determined by isocratic reverse phase HPLC according to the method previously described (7). This method measures retinol and RE using retinyl decanoate as internal standard and also separates the different RE including oleate from palmitate. Standards of retinyl decanoate, laurate, linoleate, myristate, oleate and palmitate were synthesized by condensing retinol with the appropriate fatty acyl chlorides, as described by Bhat and Lacroix (8).

TTR determinations

Plasma concentrations of TTR were determined by the rocket electroimmunodiffusion technique using specific antibodies purified from rat sera and raised in rabbits (9).

Statistical analysis

Body and organ weights, retinoid concentrations, and TTR levels were assessed for significance by a oneway analysis of variance followed by the Student-Newman-Keul's multiple comparison procedure (SNK). A value of $p < 0.05$ was considered significant for the test. Statistical analysis were conducted using the SPSS/PC+ 4.0 program (Microsoft Corp. 1988).

RESULTS

Body and organ weights

As compared to controls who had free access to food, DR-rats gained less weight during the time of experiment (Figure 1). The difference in growth curves started to be significant ($p < 0.05$) between the groups from 3 months of age or 5 weeks after the onset of dietary restriction until the end of experiment. Body weights recorded at the end of the study were strongly correlated to the degree of restriction ($r = 0.99$). Along with the lesser body weight, liver, kidney and lungs weight were reduced in DR-rats as compared to controls (Table 1). Differences were statistically significant from controls in rats submitted to 30 and 40% DR for liver and lungs and in all the DR-groups for kidney. In contrast, intestine weight was not modified by DR and was thus comparable between the groups.

TABLE 1
Organ Weights of AD LIB and DR Rats*#

	Liver	Kidney	Lungs	Intestine
	g			
AD LIB	9.7 ± 1.7	1.11 ± 0.11	1.24 ± 0.08	6.9 ± 0.4
DR10%	10.2 ± 1.1	0.98 ± 0.07 **	1.15 ± 0.13	6.6 ± 0.7
DR20%	8.4 ± 1.1	0.96 ± 0.03 **	1.17 ± 0.06	7.6 ± 0.8
DR30%	7.6 ± 0.6 **	0.90 ± 0.07 **	1.10 ± 0.07 **	7.6 ± 0.5
DR40%	6.3 ± 0.2 **	0.79 ± 0.06 **	1.09 ± 0.02 **	6.5 ± 0.6

* Abbreviations are as follows: AD LIB, free access to food; DR, dietary restriction

Values are means ± SEM ($n=10$ for AD LIB and $n=5$ for DR groups)

** Significantly different from AD LIB calculated from one way ANOVA and SNK test ($p < 0.05$)

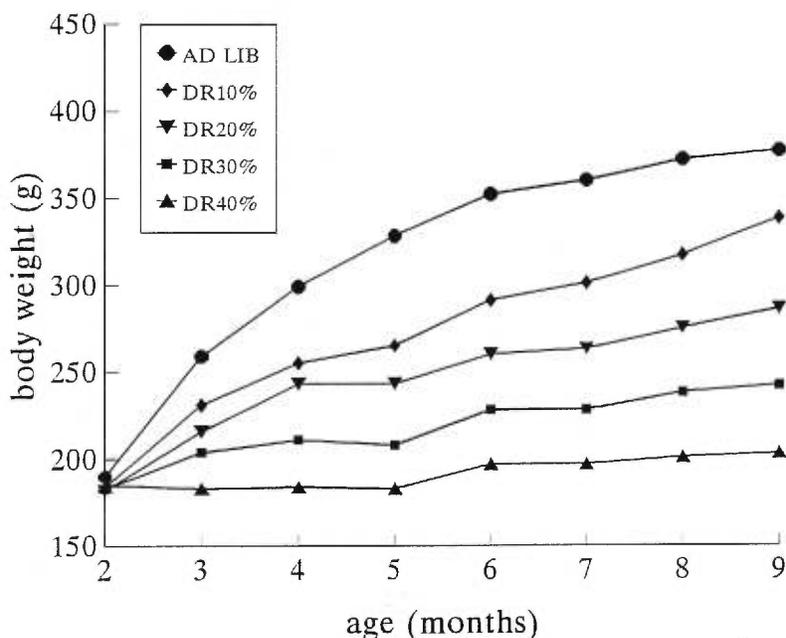


FIG.1. Body weights of controls with free access to food (AD LIB) and dietary restricted (DR) rats. Each point represents a mean value ($n=10$ for AD LIB, $n=5$ for DR groups). Body weights of DR rats were significantly different ($p < 0.05$) from AD LIB rats from 3 months of age or 5 weeks following the onset of DR to the end of the study.

Plasma retinol and TTR levels

Table 2 presents retinoid levels in plasma and liver of controls and DR-rats. Retinol, the main circulating retinoid, was significantly decreased in rats submitted to 20, 30, and 40% DR when compared to controls. Plasma TTR levels were also measured at the end of experiment. There were no significant difference in plasma TTR levels between the rats who had unrestricted access to food and DR-rats (data not shown).

Liver retinoids

In contrast to plasma, retinoids concentrations in liver did not differ significantly among the dietary groups (Table 2). Liver total content of retinoids was significantly reduced in the four groups of DR-rats due to lower liver weight than controls ($p < 0.05$). When liver retinoid content is expressed per 100 grams of body weight, no significant difference was noticeable among the groups.

Although liver retinoids concentrations were similar for all the groups, dietary restriction seemed to have influenced the distribution of the different fractions of retinoids (Table 3). In DR-rats, liver retinol levels were augmented compared to controls, with statistically significant differences noted in the 30 and 40% DR-groups. In contrast, retinyl palmitate levels, the main storage form of vitamin A in the liver, were greatly reduced in all DR-groups. Moreover, other forms of retinyl esters (namely retinyl oleate, linoleate and laurate) were found in greater amounts in DR-rats than in controls. Since the total levels of retinyl esters was maintained, the ratios of liver retinol over retinyl esters were consequently significantly augmented in all the rats submitted to DR, compared to controls.

TABLE 2

Retinoids in Plasma and Liver of AD LIB and DR Rats^{*#}

Groups	Plasma Retinol (nmol/L)	Total Liver Retinoids [†]		
		(μ mol/g)	(μ mol/liver)	(μ mol/liver/ 100g BW)
AD LIB	940 \pm 245	5.12 \pm 0.97	48.79 \pm 8.28	13.01 \pm 2.00
DR10%	843 \pm 102	2.96 \pm 0.65	29.64 \pm 3.87 **	9.28 \pm 1.48
DR20%	680 \pm 161 **	4.60 \pm 1.42	37.36 \pm 7.40 **	13.39 \pm 2.51
DR30%	744 \pm 94 **	4.57 \pm 1.03	36.26 \pm 7.86 **	14.86 \pm 3.87
DR40%	662 \pm 64 **	3.70 \pm 0.22	23.27 \pm 1.83 **	11.69 \pm 1.29

* Abbreviations as in Table 1.

Values are means \pm SEM ($n=10$ for AD LIB and $n=5$ for DR groups)

† Retinol + retinyl Esters

** Significantly different from AD LIB ($p < 0.05$) calculated from one way ANOVA and SNK test.

TABLE 3

Distribution of Liver Retinoids in AD LIB and DR Rats^{*#}

Groups	Retinol	Retinyl Palmitate	Other Retinyl Esters	Ratio Retinol/Esters
AD LIB	0.45 \pm 0.35	4.15 \pm 0.98	0.52 \pm 0.16	0.11 \pm 0.05
DR10%	0.65 \pm 0.10	1.13 \pm 0.50 **	1.18 \pm 0.32 **	0.29 \pm 0.03 **
DR20%	0.95 \pm 0.29	1.84 \pm 0.79 **	1.81 \pm 0.32 **	0.27 \pm 0.09 **
DR30%	1.03 \pm 0.24 **	1.62 \pm 0.22 **	1.96 \pm 0.79 **	0.29 \pm 0.02 **
DR40%	0.85 \pm 0.14 **	1.48 \pm 0.37 **	1.37 \pm 0.43 **	0.30 \pm 0.07 **

* Abbreviations as in Table 1.

Values are means \pm SEM ($n=10$ for AD LIB and $n=5$ for DR groups)** Significantly different from AD LIB ($p < 0.05$) calculated from one way ANOVA and SNK test.

Retinoids in peripheral organs

Table 4 shows results of retinoid levels measured in various peripheral organs. In kidney, retinoid levels tended to gradually decrease as the degree of dietary restriction increased. Significant differences from controls were noted in groups submitted to 20,30, and 40% DR. Lungs retinoid levels were drastically reduced in the four DR-groups with significant changes already observed in the DR10%-group. In the other three organs studied, e.g. intestine, retroperitoneal adipose tissue and mammary glands, there were no significant differences in retinoid levels between the groups.

TABLE 4

Total Retinoids in Peripheral Organs of AD LIB and DR Rats^{*†}

Groups	Kidney	Lungs	Intestine	Adipose Tissue	Mammary Glands
	(nmol/g)				
AD LIB	5.83 ± 0.69	24.37 ± 6.63	4.85 ± 1.31	4.74 ± 1.72	3.77 ± 1.95
DR10%	5.54 ± 0.32	7.94 ± 4.23 **	5.86 ± 0.85	4.49 ± 1.93	3.24 ± 0.93
DR20%	4.74 ± 0.22 **	6.90 ± 1.56 **	5.34 ± 1.75	5.72 ± 1.69	3.19 ± 1.61
DR30%	4.64 ± 0.41 **	7.34 ± 1.37 **	3.41 ± 0.68	6.30 ± 1.99	4.76 ± 2.34
DR40%	4.72 ± 0.71 **	9.95 ± 3.26 **	4.30 ± 0.49	6.15 ± 1.18	4.83 ± 1.34

* Abbreviations as in Table 1.

Values are means ± SEM ($n=10$ for AD LIB and $n=5$ for DR groups)

† Retinol + retinyl esters

** Significantly different from AD LIB ($p < 0.05$) calculated from one way ANOVA and SNK test.

DISCUSSION

In the present study, reduced plasma levels of retinol were found in rats subjected to DR, when compared to controls. In normal conditions, plasma levels of retinol are tightly regulated and maintained within a narrow range despite fluctuations in vitamin A intakes and hepatic stores (10). This homeostasis is largely controlled by factors mediating the input and the output of retinol from plasma.

Hepatic stores of vitamin A are a major input determinant, the liver being the main storage organ. In the present study, in all the DR-rats, hepatic retinoid concentrations are comparable to controls and represent a more than adequate supply. In the liver, vitamin A is stored mainly as retinyl esters which have to be hydrolysed to retinol in order to bind RBP and be released into the general circulation. Thus, the availability of the retinol resulting from this hydrolysis might be a limiting step to its release to plasma from the liver. Various hepatic retinyl ester hydrolase (REH) activities have been described (11) although their exact subcellular location and specificity remain unclear. In this study, we have demonstrated a higher ratio of retinol/retinyl esters in DR-rats which may indicate a greater REH activity in those animals. These observations confirm previous results obtained in this laboratory (2). However, despite the higher hepatic retinol fraction available, DR-rats still exhibit decreased circulating retinol levels.

In blood, vitamin A circulates mostly as a complex of retinol-RBP-TTR. Apo-RBP is synthesized by the liver, binds retinol and is released as holo-RBP. In circulation, holo-RBP complexes with TTR which is also synthesized by the liver. Therefore, RBP and TTR availability is a major factor in the mobilization of retinol from the liver. It may be possible that the synthesis and/or secretion of RBP and TTR are impaired in DR-rats. Protein-energy malnutrition is recognized to affect the hepatic synthesis of several proteins (5). However, the experimental model of dietary restriction described here is not conventionally considered as malnutrition (3), since diets are enriched with vitamins and minerals and rats consistently gain weight throughout their lives. Moreover, other studies have demonstrated that in long-term DR, total liver protein and albumin synthesis are normal or even increased (12,13). However, a recent study reported reduced serum TTR and TTR mRNA levels in livers of rats subjected to short-term food restriction (9). Here, we measured plasma TTR levels but at the end of long-term DR and found no influence of the dietary regimen on this protein. This may be explained by an adaptation phenomenon in the DR-rats, since in the study of LeMoullac (9), TTR levels were shown to drop after 7 days of food restriction but tended to return around control levels after 28 days of

restriction, although stayed lower than controls. It is possible that after dietary restriction of longer time duration, TTR levels would return to control values. Moreover, although TTR binds to RBP in a 1:1 molar ratio, a fraction of TTR circulates in free form (10). Thus, a lowering in plasma RBP would not be necessarily be reflected by a lowering of TTR. Also, it should be mentioned that several extra-hepatic tissues such as kidney and adipose tissue might be implicated in synthesis of RBP and releasing of holo-RBP in plasma since relative amounts of RBP mRNA have been found in these tissues (14). Peripheral organs could therefore, be involved in the lowering of plasma retinol observed in DR-rats.

The other part in the balance equation of plasma retinol homeostasis is the uptake by peripheral cells. It is now generally believed that a molecule of retinol recycles several times in blood before its final degradation and the kidneys are estimated to contribute about 50% to this recycling (6). It may be suggested that in DR-rats, there may be an accelerated turnover or utilization rate of retinol which explain our findings of lower plasma levels of retinol despite normal hepatic concentrations and decreased levels in kidneys. Under such conditions, the uptake of retinol by other peripheral organs might be more rapid than the release by the liver. These speculations however remain to be verified.

In vivo studies have reported a sparing effect of retinol by retinoic acid, reflected by lowered levels of plasma retinol. In these studies, retinoic acid was either given orally (15) or derived from an intestinal perfusion of β -carotene (16). Wang et al. (17) suggested from recent in vitro studies that retinoic acid would act via a feedback inhibition on retinol dehydrogenation and favor the retinol esterification pathway. The effects of DR on retinoic acid metabolism are unknown but it may be possible that an increased activation of retinol to retinoic acid take place in rats subjected to DR. The kidney is thought to be an important metabolic site of this activation (18). Decreased retinoid concentrations in kidneys of DR-rats would support our hypothesis of higher rate of oxidation of retinol to retinoic acid in those animals. Our hypothesis however, does not agree with the model of Wang et al. (17)

since retinol esterification does not seem to be the favored pathway in DR-rats, as demonstrated by higher hepatic retinol/retinyl ester ratio. This aspect is presently under investigation.

Another interesting aspect of our study is the effect of DR on hepatic retinol esterification. Indeed, total retinyl ester concentrations were not increased in the liver of DR-rats, however their distribution was modified. The enzymes responsible for retinol esterification are acyl CoA: retinol acyltransferase (ARAT) and lecithin: retinol acyltransferase (LRAT). Since only LRAT is able to esterify retinol bound to its specific cellular protein, CRBP, LRAT is thought to be responsible of esterification of normal retinol concentrations while ARAT would esterify the excess retinol (19). For its reaction, LRAT uses the fatty acid in position *sn*-1 of membrane phosphatidylcholine, which is a saturated fatty acid, notably palmitate (20). This is in accordance with the fact that retinyl palmitate is the main ester found in liver under normal conditions. In DR-rats however, retinyl palmitate was decreased while the fraction of other esters increased. A recent study demonstrated an influence of DR on liver membrane phosphatidylcholine fatty acid distribution (21). These investigators reported a significant increase in levels of essential fatty acids and a decrease in more peroxidable longer chain fatty acids. Unfortunately, they did not separate the fatty acids according to their position on the glycerol molecule so it is difficult to make correlations with our findings. It is likely that DR exerts an effect through the elongation-desaturation alternative pathways of precursor fatty acids to result in modifications in fatty acid distribution.

In summary, long-term DR significantly affected various aspects of vitamin A metabolism. Among other things, hepatic distribution of retinoids and plasma retinol homeostasis were modified. Different factors mediating retinol transport are currently being investigated. Given the implication of vitamin A in numerous biological processes as crucial as cellular differentiation, it remain to be elucidated how these modifications influence the action of vitamin A in rats subjected to DR.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to gratefully thank Aline Perea, Maurice Audet and Guylaine Gévry for technical assistance. This work was supported by a grant from NSERC.

REFERENCES

1. Hollander D, Dadufalza V, Weindruch R, Walford RL. Influence of life-prolonging dietary restriction on intestinal vitamin A absorption in mice. *Age* 1986; 9:57-60.
2. Ferland G, Tuchweber B, Bhat PV, Lacroix A. Effect of dietary restriction on hepatic vitamin A content in aging rats. *J of Gerontol* 1992; 47:B3-B8.
3. Yu BP. How diet influences the aging process of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205:97-105.
4. Guerrant HB. Influence of age and of vitamin A intake on the storage of vitamin A in the liver of the rat. *J Nutr* 1949; 37:37-51.
5. Olson JA. Vitamin A. In: Machlin L, ed. *Handbook of Vitamins*, 2nd, New York: Marcel Dekker Inc., 1991: 1-57.
6. Blomhoff R, Green MH, Norum KR. Vitamin A: Physiological and biochemical processing. *Annu Rev Nutr* 1992; 12:37-57.
7. Chevalier S, Tuchweber B, Bhat PV, Lacroix A. Dietary restriction reduces the incidence of NMU-induced mammary tumors and alters retinoid tissue concentrations in rats. *Nutr Cancer* 1993; 20:187-96.
8. Bhat PV, Lacroix A. Separation and estimation of fatty acyl esters in tissues of normal rat by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 1983; 272:269-78.
9. LeMoullac B, Gouache P, Bleiberg-Daniel F. Regulation of hepatic transthyretin messenger RNA levels during moderate protein and food restriction in rats. *J Nutr* 1992; 122:864-70.
10. Blomhoff R, Green MH, Balmer Green J, Berg T, Norum KR. Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev* 1991; 71:951-90.

11. Harrison EH. Enzymes catalysing the hydrolysis of retinyl esters. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1170:99-108.
12. Ferland G, Audet M, Perea A, Tuchweber B. Effect of dietary restriction on lysosomal bodies and total protein synthesis in hepatocytes of aging rats. *Mech Ageing Dev* 1992; 64:49-59.
13. Ward W, Richardson A. Effect of age on liver protein synthesis and degradation. *Hepatology* 1991; 14:935-48.
14. Soprano DR, Soprano KJ, Goodman DS. Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J Lipid Res* 1986; 27:166-71.
15. Bhat PV, Lacroix A. Effects of retinoic acid on the metabolism of vitamin A in rat liver. *Nutrition Res* 1986; 6:429-35.
16. Wang XD, Russell RM, Marini R, Tang G, Fox JG, Krinsky NI. Intestinal perfusion of β -carotene in the ferret raises retinoic acid level in portal blood. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1167:159-64.
17. Wang XD, Krinsky NI, Russell RM. Retinoic acid regulates retinol metabolism via feedback inhibition of retinol oxidation and stimulation of retinol esterification in ferret liver. *J Nutr* 1993; 123:1277-85.
18. Labrecque J, Bhat PV, Lacroix A. Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde that oxidizes retinal to retinoic acid. *Biochem Cell Biology* 1993; 71:85-9.
19. Yost RW, Harrison EH, Ross CA. Esterification by rat liver microsomes of retinol bound to cellular retinol-binding protein. *J Biol Chem* 1988; 263:18693-701.
20. Herr FM, McDonald PM, Ong DE. Solubilization and partial characterization of lecithin-retinol acyltransferase from rat liver. *J Nutr Biochem* 1991; 2:503-11.
21. Laganier S, Yu BP. Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction. *Gerontology* 1993; 39:7-18.

CHAPITRE 3. ARTICLE II

**«Lymphatic absorption of retinol in young, mature and old rats:
influence of dietary restriction»**

Stéphanie Chevalier, Guylaine Ferland et Beatriz Tuchweber

FASEB Journal **10**:1085-1090, 1996.

AVANT-PROPOS II

Dans le but de déterminer si l'accumulation des rétinoïdes au niveau du foie, typiquement observée chez les rats âgés, pouvait être attribuable à une augmentation de l'absorption intestinale, nous avons mesuré le transport lymphatique du rétinol tel qu'influencé à la fois par l'âge et par la restriction alimentaire. De la même façon, cette étude a permis d'estimer la contribution d'un changement possible dans l'absorption intestinale du rétinol aux taux hépatiques supérieurs chez les rats soumis à la restriction alimentaire.

La mesure de l'absorption intestinale par la technique de la canulation lymphatique a été choisie pour sa pertinence physiologique: non seulement reflète-t-elle le captage du rétinol par les entérocytes, mais aussi son incorporation dans les chylomicrons et son transport dans la voie lymphatique. En conséquence, une canule est insérée dans le canal lymphatique mésentérique de sorte à recueillir la lymphe provenant des capillaires lymphatiques qui drainent l'intestin grêle. Les rats reçoivent une infusion contenant du rétinol marqué, mis en solution micellaire, directement dans le duodénum. L'absorption du rétinol est évaluée par la quantité de rétinol présent par volume donné de lymphe en fonction du temps, mesure qui tient compte du débit lymphatique.

Parce que les rats en restriction ont un poids corporel inférieur à leur contrôles nourris à volonté et que la diète habituellement utilisée dans le modèle de restriction alimentaire est enrichie en micronutriments, une accumulation des nutriments liposolubles, dont la vitamine A, pourrait avoir lieu et ainsi constituer un facteur confondant dans l'interprétation des résultats. Un groupe de rats soumis à une restriction de tous les nutriments a donc été inclus dans ce protocole, afin de discerner l'effet spécifique de la restriction énergétique d'un effet possible de l'état vitaminique A. L'étude comprend donc trois groupes expérimentaux soient, nourris à volonté, soumis à une restriction alimentaire de 40% de tous les nutriments ou alors, des

macronutriments uniquement (appelée aussi restriction énergétique), pour chaque âge étudié, jeune (3 mois), adulte (12 mois) et âgé (22 mois).

**LYMPHATIC ABSORPTION OF RETINOL IN YOUNG, MATURE AND OLD
RATS: INFLUENCE OF DIETARY RESTRICTION.**

S. Chevalier, G. Ferland and B. Tuchweber¹

Département de Nutrition, Université de Montréal,
Montréal (Québec) Canada, H3C 3J7.

Shortened title: Effect of age and diet on retinol absorption.

1: To whom correspondance and reprint requests should be addressed at Département de Nutrition, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. Tel: (514) 343-6393 Fax: (514) 343-6103

2: Abbreviations: DR: dietary restriction; AL: ad libitum-fed; DR: 40%-dietary restriction of all the nutrients; DR⁺: 40%-dietary restriction of macronutrients; CRBP_{II}: cellular retinol binding protein type II; LRAT: lecithin:retinol acyltransferase.

ABSTRACT

Earlier studies have shown that hepatic vitamin A stores increase with age and that rats submitted to life long dietary restriction (DR) have greater hepatic retinoid concentrations than ad libitum-fed rats. Since it was suggested that these changes may be attributed to altered intestinal absorption, we measured retinol absorption in 3, 12, and 22 months-old female Sprague-Dawley rats fed ad libitum (AL) or a restricted diet (40%) enriched (DR⁺) or not (DR) with vitamins and minerals. An *in vivo* model was used and lymph collected from the mesenteric duct while rats were infused a micellar solution containing ³H-retinol into the proximal duodenum. Aging significantly decreased lymph flow and at all ages, DR and DR⁺-rats exhibited a higher flow than age-matched AL-rats. Absorption of retinol was not significantly modified by age in AL and DR⁺-rats. However, in DR-group, there was a marked decrease in absorption between 3 and 12 months of age. Retinol absorption was significantly higher in 12 and 22 months-old DR⁺-rats than in age-matched AL-rats, a finding that may be explained by both higher lymph flow rate and higher long-term vitamin A intake per body weight. In conclusion, the increased content of vitamin A in the livers of older AL-rats is not associated with changes in intestinal absorption. In DR rats however, retinoid accumulation in liver may be explained by increased intestinal absorption of the vitamin, though other mechanisms may be involved. A possible explanation may be a decreased output of retinol from the liver as a result of lower metabolic needs. The lower serum vitamin A concentrations observed in DR rats would tend to support this hypothesis.

Indexing key words: retinoids, dietary restriction, aging, absorption, rats

INTRODUCTION

Age and nutritional factors including protein-energy malnutrition, zinc status and most of all, vitamin A intake, have been shown to influence different aspects of retinoid metabolism, namely absorption, storage and/or transport (1). With advancing age, retinoids tend to accumulate in liver of humans (2) and rodents (3,4,5). It is interesting to note that retinyl palmitate has been identified as the major fluorophore in lipofuscin age-pigment in the rat livers (5). The reason for the hepatic retinoid accumulation associated with aging is unclear, and it has been postulated that the phenomenon could be attributed, in part, to an increased intestinal absorption of retinoids (4,6). However, studies on the effects of aging on vitamin A absorption have yielded conflicting results, some showing an increased absorption (6), other suggesting no change in absorption with aging (7,8).

Dietary restriction (DR)² is a nutritional model often used in aging studies, as it is known to increase the mean survival and maximum life span of rodents as well as retarding the onset and progression of several age-related diseases (9). This model is useful in providing senescent animals free of disease, especially nephropathy, frequently seen in female Sprague-Dawley rats fed ad libitum. Since the kidney is known to be involved in RBP-retinol metabolism, the DR model is well suited to examine retinol metabolism in aged animals without such a confounding factor.

We have previously demonstrated that this nutritional strategy also alters retinoid metabolism. Indeed, adult rats subjected to graded levels of DR starting at weaning had decreased levels of plasma retinol despite sufficient liver stores and normal transport to peripheral tissues (10). Moreover, we have shown that rats subjected to a long term DR had greater hepatic stores of retinoids compared to ad libitum-fed rats (4). In the liver (and some extrahepatic tissues), retinoids are stored in their ester form, mainly in stellate cells where they are found in large lipid droplets (11). In DR-rats, the higher hepatic retinoid concentrations were associated with both a higher stellate cell number and greater cell volume, compared to ad libitum-fed rats.

Hollander et al. (8) have suggested that in the DR model, liver retinoid accumulation could be explained through an increment in intestinal absorption.

To better understand the influence of age and DR on intestinal retinol absorption, we measured the direct transport of retinol into the lymphatic circulation in young, mature and old rats. In most studies using DR, the total energy intake is reduced compared to ad libitum regimen, but not the intakes of vitamins and minerals. However, since body weights of DR-rats are inevitably reduced, the relative intake of vitamins and minerals of these animals is increased when compared to ad libitum-fed rats. This is a factor to consider when interpreting the results. To avoid such confounding factor, the classical model (40% restriction of total energy with intakes of vitamins and minerals similar to that of ad libitum-fed rats) was studied along with another DR regimen which consisted in a 40% restriction of all nutrients (total energy and vitamins and minerals). With this approach, we were able to test the possible specific effect of energy restriction versus vitamin A status.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Female Sprague-Dawley weaning rats (Charles River Canada Inc., St-Constant, Québec, Canada) were either fed ad libitum (AL) or maintained on a 40%-DR of all nutrients (DR) or a 40%-DR of macronutrients only (DR⁺) so that the daily intake of vitamins and minerals was comparable to controls. The control diet was a semi-synthetic powdered diet prepared according to the Teklad control diet #TD 89248 (Teklad Test Diets, Madison, WI) and contained 20.8 nmol retinol/g of diet, as retinyl acetate. The DR⁺ diet was enriched with ICN Vitamin Diet Fortification Mixture and AIN-76 Mineral Mixture (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) and contained 34.8 nmol retinol/g of diet. Both diets provided a physiological energy value of 16.95 kJ/g of diet. All rats were housed in the same room with controlled temperature (22° C), humidity and lighting cycle of 12 hours, starting at 4:00 am. DR and DR⁺-rats were

fed just before dark so that they would eat during the same period as controls. Rats were weighed once a week and food intake was monitored twice a week during growth period and bi-weekly thereafter. Rats were raised until the ages of 3 (young), 12 (mature) and 22 (old) months. Between four and seven animals per group underwent the absorption study.

In vivo study techniques

Surgical procedures and *in vivo* studies were revised and approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

One hour prior to cannulation, fasting rats were given 1 mL of corn oil per os to opacify the lymph. After anesthesia with sodium pentobarbital (5 mg/100 g body weight), the bile duct was cannulated through a midline abdominal incision. A flexible Tygon® tube (0.78 mm ID) (Fisher Scientific Company, Pittsburg, PA) was inserted post-pylorus and secured with two encircling ligatures, 1 cm apart. One additional ligature was placed just proximal to the infusion tube to prevent outflow of gastric juices in the duodenum. A Bio-Sil® tube (0.63 mm ID, 1.18 mm OD) (Sil-Med Corporation, Taunton, MA) filled with heparin was placed in the abdominal cavity through the skin on the right sub-coastal area of the rat. The mesenteric lymph duct was cannulated according to the method of Warshaw (12). The bile duct was also cannulated for bile collection in order to determine biliary secretion rate and contribution of biliary retinoids. The abdomen was closed with wound clips and covered with a humid gauze.

Body temperature was maintained at 37° C by the use of a rectal probe coupled to a thermostatically controlled heat lamp. In order to maintain anesthesia, analgesic doses of sodium pentobarbital (1/4 of the anesthetic dose) were given at 3-4 hour intervals during the study. Rats were infused with saline solution (0.9% NaCl) containing 5% glucose (5 mL/h) until the lymph became clear and lymph flow was constant (for 2.5 to 3 hours after surgery). A micellar solution consisting of ³H-

retinol (NEN®, Dupont Canada, Mississauga, Ontario), retinol 350 nM (Hoffman-LaRoche, Mississauga, Ontario), sodium taurocholate 10 mM in Krebs buffer, pH 6.5, was then infused for 5 hours at a rate of 9 mL/h. Aliquots of lymph and bile were collected in pre-weighed tubes, in 30 minute-periods on ice and under very dimmed light.

Radioactivity from ³H-retinol was measured in each aliquot using a Beckman liquid scintillation counter, and results were expressed as mean amount of retinol absorbed per 30 minute-period. Measurements were made for the last 3 hours of infusion where a plateau was reached. Lymph flow and retinol absorption were expressed per unit weight of intestine and per 100 grams of body weight to account for the differences in animals' body weights.

Statistical analysis

Group means were compared with a oneway analysis of variance followed by a multiple comparison procedure (Duncan test) to identify statistical differences. A *P* level of 0.05 was considered significant. Results are shown as means \pm SEM. Correlation between intestine weights and lengths was evaluated by Pearson's correlation coefficient.

RESULTS

Body weight, intestine weight and length

As shown in Table 1, body weights of rats increased with age, but differences proved to be significant only for AL-rats. DR slowed weight gain, as demonstrated by much smaller final body weights of DR and DR⁺-rats when compared to age-matched controls. Intestine weights also gradually increased with age in all the diet-groups, however, intestine weights were not significantly modified by DR-diets when compared to ad libitum-fed rats. Intestine lengths were highly correlated to the intestine weights ($r=0.69$ $P<0.001$). No significant difference was noted in body weights or intestine weights and lengths between DR and DR⁺-rats.

TABLE 1. *Body weight, intestine weight and length*

DIET	AL ^a	DR	DR ⁺
AGE (mo)	<i>body weight (g)</i>		
3	254.2 ± 12.4	196.2 ± 2.3	187.6 ± 6.3
12	432.8 ± 22.9*	266.0 ± 5.9 [†]	244.3 ± 5.7 [†]
22	510.3 ± 105.0*	269.7 ± 15.6 [†]	267.0 ± 12.7 [†]
	<i>intestine weight (g)</i>		
3	3.02 ± 0.27	2.52 ± 0.22	2.99 ± 0.18
12	3.31 ± 0.32	2.81 ± 0.08	3.18 ± 0.15
22	3.75 ± 0.04*	3.37 ± 0.19*	3.47 ± 0.17
	<i>intestine length (cm)</i>		
3	110.8 ± 3.9	105.4 ± 2.1	110.4 ± 3.4
12	120.8 ± 3.5	111.3 ± 2.6	124.3 ± 2.5
22	130.7 ± 3.8*	113.3 ± 1.2 [†]	118.7 ± 5.5

a: abbreviations are: AL: ad libitum; DR: 40%-dietary restriction of all nutrients; DR⁺: 40%-dietary restriction of macronutrients †: different from age-matched group AL ($P < 0.05$) *: different from diet-matched 3 months-old group ($P < 0.05$) Values are means ± SEM (n=4-7).

Lymph and bile flow

Lymph flow rate, whether expressed per unit weight of intestine or relative to body weight (Figures 1. A and B), showed the same pattern. With increasing age, lymph flow decreased significantly in all 3 diet-groups, with statistical differences noted at 12 and 22 months from the corresponding 3 months-old groups. Although lymph flow decreased gradually with advancing age, no significant difference could be noted between old and mature rats. At all ages, DR and DR⁺-rats had higher lymph flow rates than age-matched controls eating ad libitum, although the differences did not reach statistical significance in old rats. In fact, DR and DR⁺-mature and old rats maintained a lymph flow that was comparable to that of young controls.

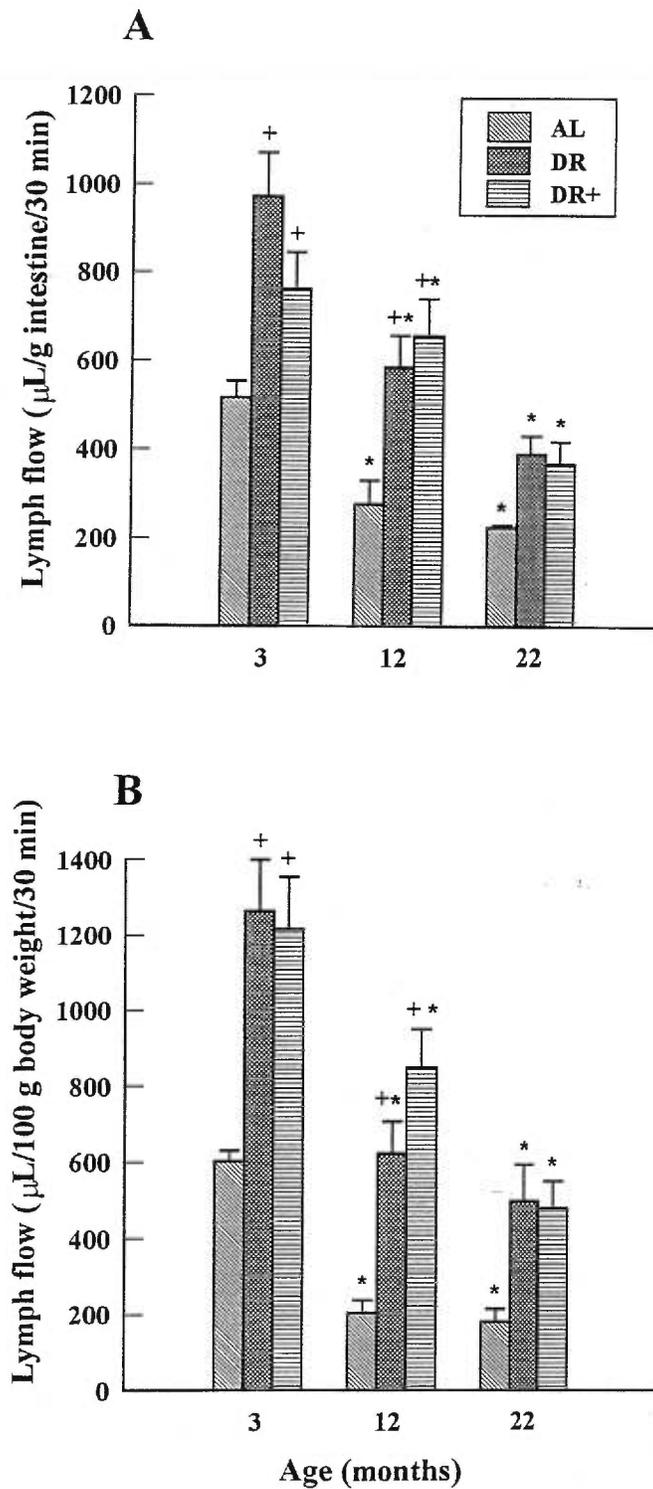


Figure 1. Lymph flow expressed as the mean amount of lymph secreted per gram of intestine (A) and per 100 grams of body weight (B) per period of 30 minutes during infusion of ^3H -retinol in micellar solution (see Materials and Methods). Values are means \pm SEM (n= 4-7). +: different from age-matched group AL ($P < 0.05$) *: different from diet-matched 3 months-old-group ($P < 0.05$).

As for lymph flow, bile flow, per gram of liver, decreased with age but was about 30% higher in DR and DR⁺-mature and old rats compared to age-matched AL-rats. This difference was further accentuated when bile flow was expressed on a 100 g body weight basis (Table 2).

TABLE 2. *Bile flow*

DIET	AL ^a	DR	DR ⁺
AGE (mo)	<i>(μL/g liver/30 min)</i>		
3	61.7 ± 4.3	70.6 ± 9.5	62.2 ± 9.4
12	42.5 ± 4.2	62.6 ± 3.8	69.7 ± 6.9 [†]
22	38.8 ± 13.3	70.4 ± 7.1 [†]	76.3 ± 4.8 [†]
	<i>(μL/100 g body weight/30 min)</i>		
3	174.7 ± 14.5	202.3 ± 25.0	182.6 ± 26.0
12	97.6 ± 8.1*	162.9 ± 7.1	196.2 ± 26.7 [†]
22	110.9 ± 35.5	183.6 ± 18.9 [†]	229.6 ± 20.0 [†]

a: abbreviations are: AL: ad libitum; DR: 40%-dietary restriction of all nutrients; DR⁺: 40%-dietary restriction of macronutrients †: different from age-matched group AL ($P < 0.05$)

*: different from diet-matched 3 months-old group ($P < 0.05$) Values are means ± SEM (n=4-7).

Retinol absorption

Retinol was absorbed mainly through the lymphatic route with an average recovery of ³H-retinol of about 20% of the infused dose, confirming results of other investigators (13,14). An average of 25 pmol ³H-retinol/period was recovered in bile, representing 2.0% of the total dose (data not shown). Effects of age and DR on lymphatic retinol absorption are depicted in Figures 2. A and B. Whether expressed per unit weight of intestine or body weight, retinol absorption was affected by age: it tended to decrease in AL-rats and decreased significantly ($P < 0.05$) in DR-rats, but only from 3 months to 12 months of age; retinol absorption remained constant from adult to advanced age. By contrast, DR⁺-rats maintained the same retinol absorption throughout their lives and showed, at 12 and 22 months, a higher retinol absorption than corresponding A-rats.

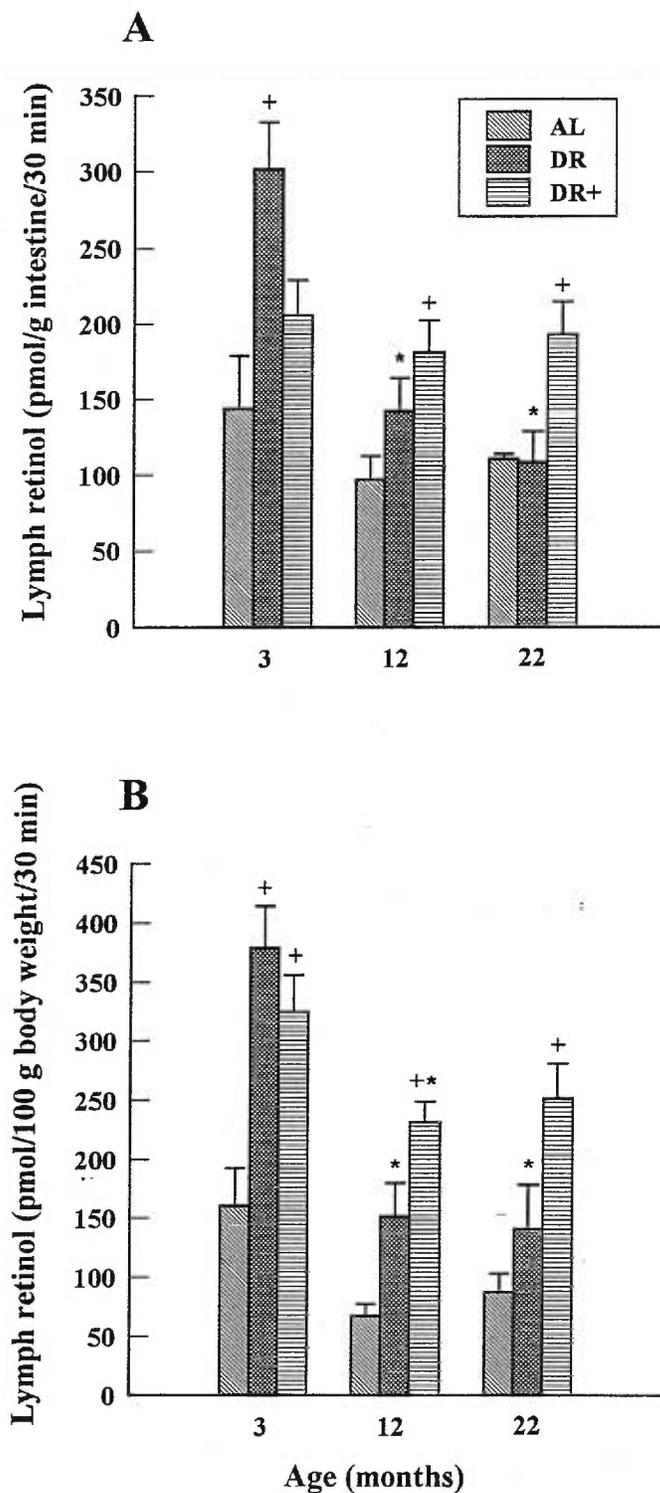


Figure 2. Lymphatic retinol absorption expressed as the mean amount of lymph retinol per gram of intestine (A) and per 100 grams of body weight (B) per period of 30 minutes during infusion of ^3H -retinol in micellar solution (see Materials and Methods). Values are means \pm SEM ($n=4-7$). +: different from age-matched group AL ($P<0.05$) *: different from diet-matched 3 months-old-group ($P<0.05$).

Liver and plasma retinoids

The hepatic retinoids concentrations were evaluated by HPLC in rats of the same colony, as described earlier (10). Retinoids, mainly as retinyl palmitate, accumulated in the liver of rats during aging, in the three diet-groups studied. While mature and old DR⁺-rats had a similar daily intake of vitamin A to that of age-matched controls eating ad libitum, these animals exhibited higher hepatic retinoid concentrations which may be attributed to lower liver weights (Table 3). Total liver retinoid content of 12 and 22 months-old DR⁺-rats were significantly higher than that of AL-rats of the same age while the content of DR-rats decreased. This difference between DR and DR⁺ is partly attributed to greater dietary intake in DR⁺ rats.

Plasma retinol levels did not vary significantly with aging in AL-rats. However, mature and old DR and DR⁺-rats had significantly lower levels than age-matched controls.

TABLE 3. *Liver and plasma retinoids*

DIET	AL ^a	DR	DR ⁺
AGE (mo)	<i>liver retinoid^b concentrations (μmol/g)</i>		
3	3.49 ± 0.54	2.50 ± 0.44	4.68 ± 0.69
12	7.49 ± 1.49*	7.58 ± 1.06*	14.25 ± 2.89 ^{††*}
22	10.59 ± 1.51 ^{**}	10.92 ± 1.53 ^{**}	21.10 ± 4.48 ^{††**}
	<i>liver retinoid^b content (μmol)</i>		
3	21.8 ± 1.0	16.1 ± 1.1	28.9 ± 1.9
12	91.7 ± 3.6*	54.3 ± 11.4 ^{†*}	111.3 ± 4.4 ^{††*}
22	124.6 ± 9.4 ^{**}	86.5 ± 3.5 ^{†**}	167.8 ± 18.6 ^{††**}
	<i>plasma retinol (μmol/L)</i>		
3	0.794 ± 0.112	0.619 ± 0.040	0.626 ± 0.081
12	1.099 ± 0.119	0.742 ± 0.124 [†]	0.678 ± 0.110 [†]
22	1.046 ± 0.078	0.460 ± 0.040 [†]	0.593 ± 0.152 [†]

a: abbreviations are: AL: ad libitum; DR: 40%-dietary restriction of all nutrients; DR⁺: 40%-dietary restriction of macronutrients b: retinol + retinyl esters †: different from age-matched group AL ($P < 0.05$) ††: different from age-matched group AL and DR ($P < 0.05$) *: different from diet-matched 3 months-old group ($P < 0.05$) **: different from diet-matched 3 and 12 months-old groups ($P < 0.05$) Values are means ± SEM (n=4-7) from other rats of the same colony.

DISCUSSION

In the present study, vitamin A absorption was evaluated by lymphatic recovery of ^3H -retinol. This approach not only reflects the intestinal uptake of retinol but also its packaging into chylomicrons and its delivery to circulation through lymphatics. With this model, the rate of retinol absorption per 100 g of body weight decreased, but not significantly, with advancing age in control rats. In the only previous study that used lymphatic cannulation in aged rats, Hollander and Dadufalza (6) reported an increase of vitamin A absorption with aging. However, it should be pointed out that if their data had been expressed relative to unit of body weight, the lymphatic absorption would actually have been decreased in the older rats compared to the young ones. In other studies using different protocols, retinol absorption was not found to vary with age (7,8). From these and our observations, it appears that the accumulation of retinoids in the liver of aging rats fed ad libitum cannot be explained by an increase of intestinal retinol absorption.

This study also showed a marked effect of advancing age on lymph flow, which is an important parameter in lymphatic transport of nutrients. Factors known to modulate the lymph flow, such as mucosal interstitium blood supply and hydration, humoral factors influencing vascular smooth muscle contractility, and intestinal motility could be altered by age. Indeed, in a recent study, the decreased rate of colonic transit found in aged rats was attributed to reduced smooth muscle tension in response to the age-dependent reduction in acetylcholine release (15). In addition, reduced physical movement has been reported in aged rats (16) and could also affect lymph flow rate through reduced intestinal motility.

Structural and compositional alterations of membranes during aging are well recognized (17). An age-related decrease in membrane fluidity has been reported in many cell types, which may result in cell dysfunction (18-20). More specifically, intestinal microvillus membranes fluidity of 17 and 117 weeks-old rats was decreased when compared to 6 weeks-old rats (21). Accordingly, decreased membrane fluidity

could partly explain the reduced lymph flow rate observed with advancing age in this study.

The maintenance of membrane integrity as well as enhanced membrane fluidity by DR during aging, could explain the higher lymph flow observed in DR-rats (18-20,22). However, other explanations may also be considered. For instance, DR might prevent the age-related decrease in intestinal motility, thus maintaining lymph flow via increased number of β -adrenergic receptors (23) or maintenance of spontaneous physical movement (16). Some of these factors may also account for the increased lymph flow rate of DR-rats observed at 3 months of age.

Overall energy restriction induced marked changes in retinol absorption, but differences were observed between the two restricted groups: lymphatic retinol absorption was decreased with age in the DR-rats but not in DR⁺-rats (except for values at 12 months when expressed per 100 g BW). An explanation for the differences in results between DR and DR⁺-rats could be that a lifetime higher vitamin A intake may increase intestinal retinol absorption, as seen in DR⁺-rats. Retinol is thought to be absorbed by the enterocyte via a specific transporter (24), followed by binding to a specific cytosolic cellular binding protein (CRBP type II) which is also the substrate for lecithin:retinol acyltransferase (LRAT) responsible for retinol esterification under physiological conditions (25). We may suggest that high long term intake of vitamin A could induce LRAT activity and expression of proteins involved in intestinal retinol absorption.

An additional factor that may be involved in the response of DR⁺-rats is the supply of phospholipids to enterocytes. It was recently reported that retinol absorption was impaired in zinc-deficient rats which was associated with a reduced supply of phospholipids to the intestinal mucosa, thus limiting the formation of chylomicrons (26). These authors postulated that the decrease in phospholipid pool was the result of a defect in the biliary secretion of phospholipids. Interestingly, in our animals, mature and old DR⁺-rats showed higher biliary phospholipid to bile salt ratio than

age-matched controls and DR-rats (27) which correlated with the higher absorption of retinol in DR⁺-rats.

In summary, the results presented in this study indicate that liver retinoid accumulation during aging cannot be explained by increased lymphatic retinol transport. However, increased absorption appears to be a contributing factor in the higher hepatic vitamin A levels seen with DR, when enriched with vitamins and minerals. Results indicate that increased lymphatic retinol absorption in DR⁺-rats may be the result of both higher lymph flow and higher long-term vitamin A intake per body weight. An additional explanation for retinoid accumulation in liver, besides increased intestinal absorption, may be a decreased output of retinol from the liver as a result of lower metabolic needs in DR-rats. Recent preliminary data on plasma retinol transport would tend to support this hypothesis (28).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge the precious technical assistance of Aline Perea and Maurice Audet. Retinol was given generously by Hoffman-LaRoche. During this study, SC was recipient of FCAR scholarship. This work was supported by a grant from the National Science and Engineering Research Council of Canada.

REFERENCES

1. Blomhoff R., Green M.H., Balmer Green J., Berg T., and Norum K.R. (1991) Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol. Rev.* **71**, 951-990
2. Underwood B.A., Siegel H., Wiesell R.C., and Dolinski M. (1970) Liver stores of vitamin A in a normal population dying suddenly or rapidly from unnatural causes in New York city. *Am. J. Clin. Nutr.* **23**, 1037-1042
3. Sundboom J. and Olson J.A. (1984) Effect of aging on the storage and catabolism of vitamin A in mice. *Exp. Gerontol.* **19**, 257-265
4. Ferland G., Tuchweber B., Bhat P.V., and Lacroix A. (1992) Effect of dietary restriction on hepatic vitamin A content in aging rats. *J. Gerontol.* **47**, B3-B8
5. Sweda L.I. (1994) Age-related increase in liver retinyl palmitate: relationship to lipofuscin. *J. Biol. Chem.* **269**, 8712-8715
6. Hollander D. and Dadufalza V. (1990) Influence of aging on vitamin A transport into the lymphatic circulation. *Exp. Gerontol.* **25**, 61-65
7. Fleming B.B. and Barrows C.H. Jr. (1982) The influence of aging on intestinal absorption of vitamins A and D by the rat. *Exp. Gerontol.* **17**, 115-120
8. Hollander D., Dadufalza V., Weindruch R., and Walford R.L. (1986) Influence of life-prolonging dietary restriction on intestinal vitamin A absorption in mice. *Age* **9**, 57-60
9. Yu B.P. (1994) How diet influences the aging process of the rat. *P.S.E.B.M.* **205**, 97-105
10. Chevalier S., Tuchweber B., Vranckx R., Bhat P.V., and Lacroix A. (1995) Vitamin A status in rats submitted to graded levels of dietary restriction. *Nutr. Res.* **15**, 859-867
11. Blomhoff R. and Wake K. (1991) Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *FASEB J.* **5**, 271-277
12. Warshaw A.L. (1972) Technique: a simplified method of cannulating the intestinal lymphatic of the rat. *Gut* **13**, 66-67
13. Hollander D. (1980) Retinol lymphatic and portal transport: influence of pH, bile, and fatty acids. *Am. J. Physiol.* **239**, G210-G214

14. Fernandez E. and Borgstrom B. (1990) Intestinal absorption of retinol and retinyl palmitate in the rat: effects of tetrahydrolipstatin. *Lipids* **25**, 549-552
15. Roberts D., Gelperin D., and Wiley J.W. (1994) Evidence for age-associated reduction in acetylcholine release and smooth muscle response in the rat colon. *Am. J. Physiol.* **267**, G515-G522
16. Yu B.P., Masoro E.J., and McMahan C.A. (1985) Nutritional influences on aging of Fisher 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J. Gerontol* **40**, 657-670
17. Yu B.P. (1990) Food restriction research: Past and present status. *Aging* **4**, 349-371
18. Yu B.P., Suescun E.A., and Yang S.Y. (1992) Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A₂: modulation by dietary restriction. *Mech. Ageing Dev.* **65**, 17-33
19. Levin G., Cogan U. and, Mokady S. (1992) Food restriction and membrane fluidity. *Mech. Ageing Dev.* **62**, 137-141
20. Byun D.S., Venkatraman J.T., Yu B.P., and Fernandes G. (1995) Modulation of antioxidant activities and immune response by food restriction in aging Fisher-344 rats. *Aging* **7**, 40-48
21. Brasitus T.A., Yeh K.Y., Holt P.R., and Schachter D. (1984) Lipid fluidity and composition of intestinal microvillus membranes isolated from rats of different ages. *Biochim. Biophys. Acta* **778**, 341-348
22. Laganriere S. and Yu B.P. (1989) Effect of chronic food restriction in aging rats. I. Liver subcellular membranes. *Mech. Ageing Dev.* **48**, 207-219
23. Scarpace P.J. and Yu B.P. (1987) Diet restriction retards the age-related loss of beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase activity in rat lung. *J. Gerontol.* **42**, 442-446
24. Dew S.E. and Ong D.E. (1994) Specificity of the retinol transporter of the rat small intestine brush border. *Biochemistry* **33**, 12340-12345
25. Yost R.W., Harrison E.H., and Ross C.A. (1988) Esterification by rat liver microsomes of retinol bound to cellular retinol-binding protein. *J. Biol. Chem.* **263**, 18693-18701

26. Ahn J. and Koo S.I. (1995) Effects of zinc and essential fatty acid deficiencies on the lymphatic absorption of vitamin A and secretion of phospholipids. *J. Nutr. Biochem.* **6**, 595-603
27. Bouchard G., Chevalier S., Perea A., Yousef I.M., and Tuchweber B. (1995) Beneficial effect of dietary restriction on bile formation in aging rats: evidence for a role of glutathione. *Gastroenterol.* **108**, A717
28. Chevalier S., Wei S., Piantedosi R., Blaner W.S., and Tuchweber B. (1996) Dietary restriction alters retinol transport and storage in aging rats. *FASEB J.* **10**, A524

CHAPITRE 4. ARTICLE III

**«Dietary restriction alters retinol and retinol-binding protein metabolism
in aging rats»**

Stéphanie Chevalier, William S. Blaner, Véronique Azais-Braesco et
Beatriz Tuchweber

Soumis à **Journal of Lipid Research**

AVANT-PROPOS III

Pour donner suite aux précédents articles, il s'avérait d'intérêt de déterminer l'état nutritionnel en vitamine A, tel qu'influencé à la fois par le vieillissement et la restriction alimentaire. Une réduction de la rétinolémie ayant été décrite chez des rats adultes soumis à la restriction alimentaire malgré un état nutritionnel adéquat en vitamine A, ce présent article vise à cerner plus précisément les causes de cette diminution. Dans cet optique, il a été postulé que la synthèse et/ou la sécrétion hépatique de la RBP, protéine spécifique de transport du rétinol, puissent être influencées par la restriction alimentaire. Par conséquent, les taux de RBP plasmatiques et hépatiques ont été mesurés et sa synthèse estimée par les taux d'ARN messager, chez les mêmes groupes de rats que ceux décrits dans l'article précédent. Le fait d'utiliser deux types de diètes pour la restriction, l'une enrichie en micronutriments et l'autre pas, a permis de distinguer l'effet d'un apport alimentaire globalement réduit par opposition à une restriction purement énergétique, sur le métabolisme de la RBP. A titre comparatif, les même mesures des taux de TTR, l'autre protéine du complexe de transport plasmatique, ont été effectuées ainsi que certains autres paramètres relatifs au métabolisme et au transport du rétinol.

**DIETARY RESTRICTION ALTERS RETINOL AND RETINOL-BINDING
PROTEIN METABOLISM IN AGING RATS.**

Stéphanie Chevalier[†], William S. Blaner[§], Véronique Azais-Braesco[‡],
and Beatriz Tuchweber^{†1}

[†]Department of Nutrition, University of Montreal, Montreal, Qué., Canada, H3C 3J7.

[§]Institute of Human Nutrition, Columbia University, New York, NY 10032, USA.

[‡]I.N.R.A. Metabolic Diseases and Micronutrients Research Unit, CRNH, BP 321,
63009 Clermont-Ferrand cedex 01, France.

Abbreviations: AL, ad libitum; DR, dietary restriction; DR⁺, dietary restriction enriched with micronutrients; HPLC, high performance liquid chromatography; RBP, retinol-binding protein; CRBP, cellular retinol-binding protein type I; TTR, transthyretin; REH, retinyl ester hydrolase.

1: To whom correspondence should be addressed

Running page headline: Retinol metabolism in dietary restriction and aging

ABSTRACT

Recent studies reported that retinoid metabolism was influenced by long-term dietary restriction (DR), in rats. Since plasma retinol was decreased in rats subjected to DR, it was thought that this dietary manipulation may have an effect on retinol binding-protein (RBP) metabolism. Thus, this study was aimed to assess retinol, RBP and transthyretin (TTR) levels in plasma and liver of young (3 mo), adult (12 mo), and old (22 mo) female Sprague Dawley rats fed ad libitum (AL) or subjected to a 40%-DR, enriched (DR⁺) or not (DR) with vitamins and minerals. Results indicate that hepatic retinoid concentrations and total content increased with age in all the groups. Adult and old DR⁺ rats showed higher hepatic retinoid concentrations than age-matched AL and DR rats. DR and DR⁺ rats exhibited significantly lower plasma RBP-retinol and higher total retinoic acid levels than corresponding controls while these parameters were not influenced by aging. Liver RBP levels were also decreased in DR and DR⁺ rats when compared to respective AL controls. There was a slight age-related decline in plasma TTR levels in DR and DR⁺ rats which was not associated to modifications in liver TTR levels. Hepatic gene expression of RBP and TTR, as evaluated by Northern blot hybridization, did not change with age or diet, while CRBP mRNA levels were found to be higher in old DR and DR⁺ rats than in age-matched AL rats. In summary, these results suggest that the lower levels of plasma RBP-retinol and liver RBP in non-vitamin A-deficient rats subjected to DR, may reflect post-transcriptional alterations and/or accelerated degradation of hepatic RBP.

Supplementary key words: retinoids, dietary restriction, aging, retinol-binding protein, rats

INTRODUCTION

Restriction of energy intake without malnutrition is regarded as the most potent means of prolonging life span and delaying the onset of age-related diseases in experimental animals (1). This simple dietary manipulation modulates numerous biological changes with aging through hormonal and immune systems, cellular functions, oxidative status and reproductive activity (1). In addition, it was recently shown that long-term dietary restriction (DR) results in alterations of retinoid metabolism. We have reported that liver retinoid concentrations of aged DR rats were increased when compared to controls eating ad libitum (2). Furthermore, retinol intestinal absorption was increased in DR-rats having similar vitamin A intake as controls, which may partly account for their high hepatic retinoid concentrations (3).

In earlier studies from this laboratory it was found that adult DR rats had lower plasma retinol levels than ad libitum-fed rats, although they were not vitamin A-deficient and most of their peripheral tissue retinoid concentrations were normal (4). It was thus postulated that DR may affect hepatic retinol binding protein (RBP) synthesis and/or secretion. The present study investigated retinoid and RBP metabolism as influenced by DR, in aging rats. Two other proteins involved in plasma and intracellular transport of retinol, transthyretin (TTR) and cellular retinol-binding protein (CRBP), respectively, were also studied. In addition, two different models of DR were tested: one in which a 40% restriction of all the nutrients was applied (DR) and another in which the intake of vitamins and minerals was similar to controls eating ad libitum (DR⁺). This approach tested the possibility of specific effects of energy restriction versus vitamin A status.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

This protocol was revised and approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Details regarding the aging rat colony have been previously published (3). Briefly, weanling female Sprague-Dawley rats (Charles River Canada Inc., St.-Constant, Québec, Canada) were either fed ad libitum (AL) a semi-synthetic diet prepared according to the Teklad control diet #TD89248 (Teklad Test Diets, Madison, WI) or subjected to a 40% dietary restriction (DR) of the same diet. One additional group (DR⁺) was fed this diet, enriched with vitamins and minerals so that daily intakes of micronutrients were similar to AL rats. Rats were raised until age 3 (young), 12 (mature), and 22 (old) months when they were sacrificed.

Under ether anesthesia, blood was drawn from rats by abdominal aorta puncture. Heparinized blood was centrifuged at 4° C, 500 g, to obtain plasma. Liver, kidneys, small intestine (post-pylorus to caecum), lungs, intra-abdominal adipose tissue and brain were quickly excised, washed in a 0.9% NaCl solution, weighed and frozen in liquid nitrogen. Plasma and tissues were kept at -80° C and protected from light until further analysis. Rats with overt renal disease at autopsies (observed exclusively in the old AL rats) were excluded from further analysis, since these pathologies are known to interfere with retinol metabolism.

HPLC analysis of retinoids

All the extraction procedures were carried out under yellow light to protect retinoids from isomerization. Retinol and retinyl esters were extracted from plasma and tissue homogenates in phosphate buffer, pH 7.4, by petroleum ether following ethanol precipitation of the proteins. These retinoids were separated and quantified by a isocratic reverse-phase HPLC system, using retinyl decanoate as internal standard, as described elsewhere (4). Retinoids were eluted from a LC-18 column (Supelcosil #5-8298, Supelco Park, Bellefonte, PA) with a mobile phase consisting of

acetonitrile:methylene chloride:methanol (70:20:10), at a flow rate of 1.7 mL/min., and detected by UV absorbance at 326 nm. Retinol and different retinyl esters were identified by co-elution with authentic standards either obtained as a generous gift from Hoffman-LaRoche (retinol), purchased from Sigma (retinyl palmitate) or synthesized in our laboratory (retinyl oleate, stearate, linoleate, laurate, myristate) according to known procedures (5).

Retinoic acid was extracted from individual plasma samples by chloroform:methanol (2:1), separated from other lipids by solid phase extraction on aminopropyl columns (Supelco Inc., Bellefonte, PA), and analysed by normal-phase HPLC (Waters Associates). *All-trans*, *13-cis* and *9-cis* retinoic acid isomers were eluted with hexane:acetonitrile:acetic acid (99.5:0.4:0.1) from two silica columns linked in series and quantified by in-line detection (350 nm) of tracer [^3H]-retinoic acid added to the extracts. Using this system, the limit of detection was about 0.5 ng/mL of plasma (1.83 nmol/mL). It should be mentioned that the plasma samples used for retinoic acid measurements were stored at -80°C for approximately one year and a half, and stability of retinoic acid has not been assessed from plasma stored for that period of time.

Radioimmunoassays of RBP and TTR

Levels of RBP and TTR were determined in plasma and liver homogenates by radioimmunoassay techniques previously described (6). Retinol-binding protein and TTR were detected and quantified using anti-rat plasma RBP raised in sheep and anti-rat TTR raised in rabbit, respectively. Known amounts of purified rat RBP and TTR were used as standards.

RNA isolation and Northern analysis

The procedures used for RNA isolation and Northern analysis have been described in detail in a recent publication (7). Total RNA was isolated from liver homogenates using phenol:chloroform:isoamyl alcohol extractions according to the

method of Tushinski et al. (8). Twenty μg of total RNA was subjected to electrophoresis on 1% agarose, 0.98 M formaldehyde gel, and transferred to nylon membranes. The membranes were prehybridized for 1 hour at 65° C and then hybridized overnight with ^{32}P -labeled probes ($2.5\text{-}3.5 \times 10^6$ cpm/mL) specific for rat RBP and CRBP mRNA_s and murine TTR and β -actin mRNA. The probes were obtained by nick translation of respective cDNA clones, as previously described (9,10,11). Specific mRNA levels were determined on washed membranes using a PhosphorImager[®]. RBP, TTR and CRBP mRNA levels were normalized for β -actin expression, which was not influenced by DR (12,13).

Acid retinyl ester hydrolase activity

Acid retinyl ester hydrolase (aREH) activity was assayed in liver homogenates, as previously described (14) except that the liposomes which contained the substrate were prepared according to Grolier et al. (15). Briefly, an ethanolic solution of retinyl palmitate, phosphatidylcholine, cholesterol, and dicetyl phosphate was dispersed in a 30 mM phosphate buffer, containing 1 μM 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), which is a tocopherol analogue. After evaporation and filtration, the liposomes obtained were used as the substrate for aREH activity. They were incubated at 37° C, in a citrate buffer (pH 4.1) together with the liver homogenate which contained the enzyme activity to be assayed. Retinol formation was monitored after 90 min. and corrected for endogenous retinol in the liver homogenates and for non-enzymatic retinol formation, using blank incubations. Every assay was carried out in duplicate.

Neutral retinyl ester hydrolase activity

Neutral bile salt-dependent retinyl ester hydrolase (nREH) activity was measured in whole liver homogenate according to the method described by Cooper (16). Retinol formed during incubation was quantified by HPLC procedures detailed above, and corrected for endogenous retinol and non-enzymatic retinol formation. Liver protein concentrations were evaluated by the method of Lowry et al. (17) using bovine albumin as the standard (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO).

Statistical analysis

Comparisons of the means between groups were assessed by a one-way analysis of variance followed by Duncan's test with a *P* value of 0.05. Results are presented as means \pm SEM for groups of 4-8 samples.

RESULTS

Body and organ weights

All groups started with similar initial body weights, but DR and DR⁺ rats had a much slower, though constant, body weight gain. DR and DR⁺ rats demonstrated a significant difference in body weight from AL rats from 8 weeks of life (4 weeks after the onset of DR) until the end of the study (results not illustrated). Maximum body weight was reached at 12 months of age in all the groups. Enrichment of the DR-diet with vitamins and minerals did not result in any difference in body weight gain or final body weight compared to the DR-group (Table 1).

In general, there was an increase in weight for all the tissues examined between 3 and 12 months of age, but no further significant increase thereafter. Liver weight was significantly lower in 12 and 22 months-old DR and DR⁺ rats than in respective AL controls. Although there was, in DR and DR⁺ rats, a general tendency to lower tissue weights for lungs and kidney, intestine and brain weights were not different from those of AL rats. Thus, the influence of global energy restriction on growth was tissue-specific. As observed for body weight, there was no difference between the two DR-diet groups with regard to the weights of the tissues examined.

TABLE 1. Body and organ weights of young, mature, and old rats fed ad libitum or dietary restricted.

Diet	AL	DR	DR ⁺
Age (mo)	Body weight (g)		
3	231.3 ± 9.6	191.3 ± 4.5	183.0 ± 1.1
12	486.0 ± 28.1 ^b	263.6 ± 11.8 ^a	241.3 ± 8.1 ^a
22	468.5 ± 73.5 ^b	252.8 ± 8.0 ^a	259.3 ± 10.3 ^a
	Liver weight (g)		
3	6.33 ± 0.34	6.43 ± 0.17	6.17 ± 0.26
12	12.65 ± 1.21 ^b	8.49 ± 0.46 ^{ab}	7.96 ± 0.98 ^{ab}
22	11.99 ± 1.13 ^b	7.99 ± 0.37 ^a	7.85 ± 0.10 ^a
	Intestine weight (g)		
3	2.51 ± 0.12	2.61 ± 0.17	2.49 ± 0.08
12	2.75 ± 0.21	2.79 ± 0.10	2.88 ± 0.15
22	3.25 ± 0.26 ^b	3.19 ± 0.27 ^b	3.07 ± 0.24
	Lungs weight (g)		
3	1.06 ± 0.04	0.93 ± 0.02 ^a	0.87 ± 0.02 ^a
12	1.22 ± 0.04 ^b	1.14 ± 0.03 ^b	1.14 ± 0.06 ^b
22	1.44 ± 0.14 ^b	1.13 ± 0.03 ^{ab}	1.11 ± 0.04 ^{ab}
	Kidney weight (g)		
3	0.94 ± 0.05	0.79 ± 0.04	0.80 ± 0.03
12	1.47 ± 0.13 ^b	1.07 ± 0.08 ^{ab}	1.04 ± 0.05 ^{ab}
22	1.01 ± 0.24	1.04 ± 0.07 ^b	1.05 ± 0.02 ^b
	Brain weight (g)		
3	1.75 ± 0.02	1.91 ± 0.05	1.84 ± 0.07
12	1.78 ± 0.03	1.94 ± 0.06	1.81 ± 0.11
22	1.75 ± 0.03	1.88 ± 0.07	1.95 ± 0.02 ^b

Mean ± SEM (n=4-8)

a: different from age-matched control AL-group ($P < 0.05$)

b: different from diet-matched 3 month-old-group ($P < 0.05$)

Plasma, liver, and tissue retinoids

Plasma retinol levels were not significantly modified by age (Figure 1). In contrast, they were decreased significantly in mature and old DR and DR⁺ rats as compared to respective controls eating ad libitum. This decrease in plasma retinol was not associated with low levels of hepatic retinoids. In fact, mature and old DR rats had similar retinoid concentrations (per g of liver) to age-matched AL rats, while DR⁺ rats had almost twice that amount (Table 2). An increased accumulation of hepatic retinoids with age was observed for the 3 diets studied. Considering similar daily intake of vitamin A, mature and old DR⁺ rats had higher total liver retinoid content than respective AL rats. DR rats, who ingested 40% less vitamin A, showed lower hepatic content than AL and DR⁺ rats (results not illustrated)

Besides liver, retinoid concentrations were measured in several target tissues such as the small intestine, the lungs, the kidney, and the brain (Table 2). In control AL rats, retinoid levels tended to increase with age in intestine and kidney, but not in lungs and brain. Except in the intestine of 22 month-old DR rats, DR and DR⁺ rats did not show decreased levels of retinoids in the peripheral tissues studied when compared to AL controls. Overall, similar or higher levels of tissue retinoids were found in DR⁺ rats than in controls eating ad libitum. Thus, although plasma retinol levels were decreased in DR and DR⁺ rats, retinol was transported efficiently to the peripheral tissues of these animals.

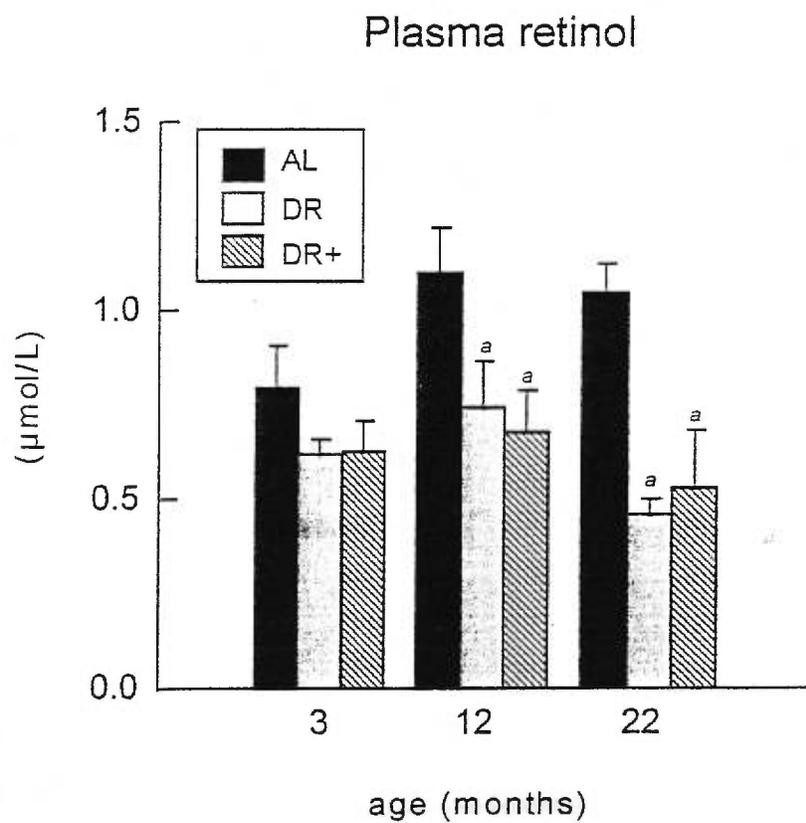


Figure 1. Effect of age and dietary restriction on plasma retinol levels in young, mature, and old rats. Results are presented as means \pm SEM for 4-8 animals per group. Abbreviations are AL: ad libitum-fed rats, DR: dietary restricted (40%) rats, DR⁺: dietary restricted (40%) rats ingesting a diet enriched with micronutrients. *a*: different from age-matched control AL group ($P < 0.05$).

TABLE 2. Tissue retinol and retinyl ester concentrations of young, mature, and old rats fed ad libitum or dietary-restricted.

Diet	AL	DR	DR ⁺
Age (mo)	Liver ($\mu\text{mol/g}$)		
3	3.49 \pm 0.54	2.50 \pm 0.44	4.68 \pm 0.69
12	7.49 \pm 1.49 ^b	7.58 \pm 1.06 ^b	14.25 \pm 2.89 ^{abd}
22	10.59 \pm 1.51 ^c	10.92 \pm 1.53 ^c	21.10 \pm 4.48 ^{acd}
	Intestine (nmol/g)		
3	8.61 \pm 0.52	7.56 \pm 2.29	15.09 \pm 0.97 ^{ad}
12	12.61 \pm 2.58	11.74 \pm 1.76	15.43 \pm 2.35
22	15.21 \pm 3.63 ^b	8.88 \pm 1.39 ^a	16.86 \pm 2.49 ^d
	Lungs (nmol/g)		
3	33.97 \pm 5.68	35.14 \pm 5.01	75.88 \pm 9.89 ^{ad}
12	35.00 \pm 2.65	43.74 \pm 6.67	49.79 \pm 6.86
22	33.46 \pm 4.38	40.63 \pm 6.53	83.26 \pm 11.39 ^{ad}
	Kidney (nmol/g)		
3	3.29 \pm 0.48	3.10 \pm 0.41	3.00 \pm 0.52
12	5.03 \pm 0.57	4.95 \pm 0.79	5.41 \pm 0.85 ^b
22	5.07 \pm 0.78	5.51 \pm 0.87	4.16 \pm 1.92
	Brain (nmol/g)		
3	1.05 \pm 0.18	1.30 \pm 0.26	0.98 \pm 0.15
12	0.94 \pm 0.10	0.99 \pm 0.19	1.10 \pm 0.14
22	1.02 \pm 0.09	1.48 \pm 0.59	1.56 \pm 0.30

Mean \pm SEM (n=4-8). Total retinoids = retinol + retinyl esters

a: different from age-matched control AL group ($P < 0.05$)

b: different from diet-matched 3 month-old group ($P < 0.05$)

c: different from diet-matched 3 and 12 month-old group ($P < 0.05$)

d: different from age-matched DR group ($P < 0.05$)

In contrast to the reduced plasma retinol levels, total retinoic acid levels were significantly higher in adult and old DR and DR⁺ than in respective controls (Table 3). Of the isomers evaluated, all-*trans* retinoic acid showed a tendency to increase in DR and DR⁺ rats, while 13-*cis* and 9-*cis* retinoic acid were markedly elevated in these animals, when compared to AL rats. Plasma retinoic acid levels were not significantly influenced by age, in our conditions.

TABLE 3. Plasma retinoic acid levels of young, mature, and old rats fed ad libitum or dietary-restricted

	<i>n</i>	13- <i>cis</i> RA	9- <i>cis</i> RA	all- <i>trans</i> RA	total RA
(nmol/L)					
3 months					
AL	4	1.90 ± 1.11	ND	4.39 ± 1.14	6.30 ± 2.03
DR + DR ⁺	7	1.42 ± 0.94	0.26 ± 0.26	5.02 ± 1.55	6.94 ± 2.63
12 months					
AL	5	0.81 ± 0.81	0.58 ± 0.58	2.11 ± 0.80	3.50 ± 1.33
DR + DR ⁺	4	4.59 ± 1.47	4.81 ± 0.89 ^a	3.61 ± 1.21	12.29 ± 2.30 ^a
22 months					
AL	4	ND	ND	2.52 ± 2.06	2.52 ± 2.06
DR + DR ⁺	4	3.95 ± 1.62 ^a	5.87 ± 0.74 ^a	2.62 ± 0.57	12.44 ± 1.71 ^a

Mean ± SEM (since there was no significant difference in RA levels between DR and DR⁺ groups, these data were pooled)

^a: different from age-matched control AL group ($P < 0.05$)

ND: below detection limit (see materials and methods)

Liver acid and neutral REH activity

As can be seen in Figure 2 a., both young DR and DR⁺ groups showed a significantly lower acid REH activity as compared to their age-matched AL group. However, this effect of DR was not observed later in life, as evidenced by higher enzyme activity for 12 months-old DR⁺ rats compared to respective controls and similar activity in 22 month-old rats.

Liver neutral REH activity showed large intra-group variability and did not differ significantly between DR, DR⁺ and AL rats of the same age (Figure 2 b.). Although not reaching a statistically significant level, there was a tendency towards decreased nREH activity in old rats fed ad libitum.

Despite punctual differences in acid and neutral REH activities between the groups, the amount of free retinol present in the liver tended to decrease with aging but was not significantly different between AL and DR groups of the same age. As a percentage of total hepatic retinoid, free retinol represented 1.35 ± 0.55 , 1.72 ± 0.99 , 1.34 ± 0.75 , 0.73 ± 0.45 , 0.70 ± 0.30 , 0.45 ± 0.23 , 0.54 ± 0.43 , 1.27 ± 0.88 , and 0.48 ± 0.28 in young AL, DR, DR⁺, mature AL, DR, DR⁺, and old AL, DR and DR⁺ rats, respectively.

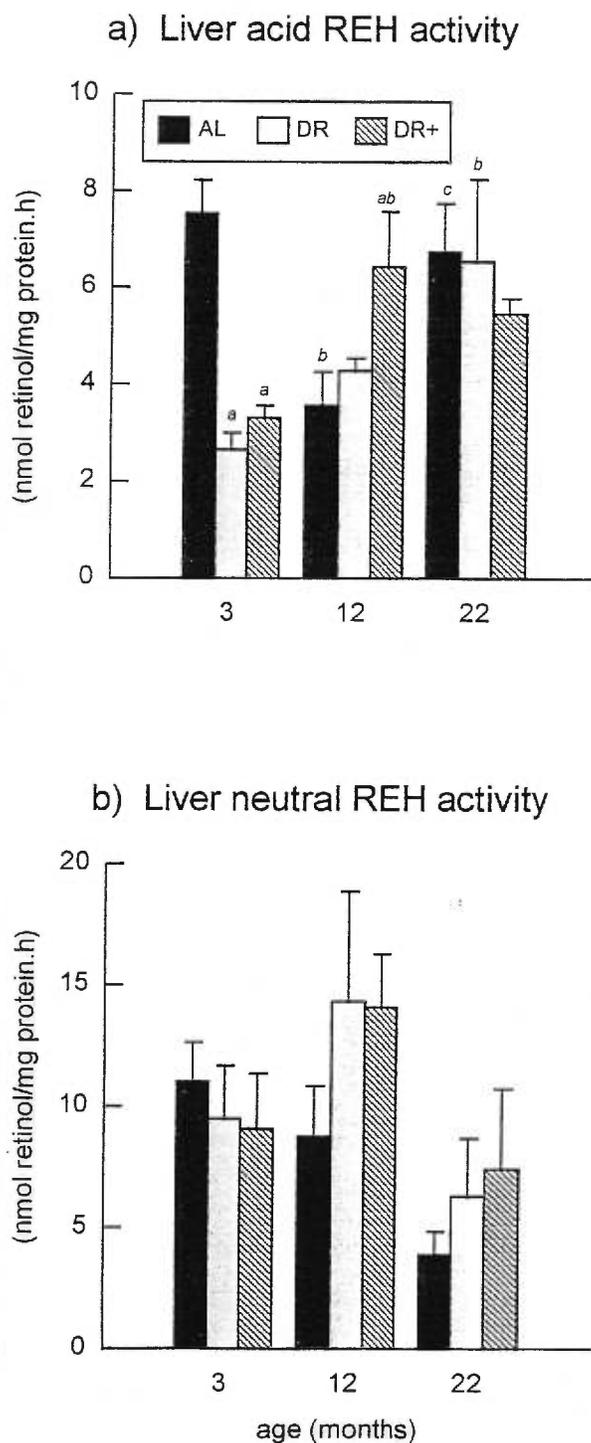


Figure 2. Effect of age and dietary restriction on liver acid (a) and neutral (b) retinyl ester hydrolase (REH) activity in young, mature, and old rats. Results are presented as means \pm SEM ($n=4-8$). Abbreviations are as in Figure 1. *a*: different from age-matched control AL group ($P < 0.05$) *b*: different from diet-matched 3 month-old group ($P < 0.05$) *c*: different from diet-matched 12 month-old group ($P < 0.05$)

Plasma and liver RBP and TTR levels

As illustrated in Figure 3 a., plasma RBP levels were significantly lower in adult and old DR and DR⁺ rats than in control rats of the same age, and were therefore highly correlated ($r=0.70$ $P<0.001$) to plasma retinol levels. The same trend was observed in liver RBP levels (Figure 3 b.), but differences between both DR rats and AL rats were already noticeable at 3 months of age. In contrast to plasma RBP, which was not significantly affected by age, there was a gradual decline in liver RBP with advancing age, which was significant only in AL and DR⁺ rats.

Plasma TTR was not affected by DR to the same extent as plasma RBP: the only significant change was a decrease in the 12 month-old DR⁺ group compared to controls (Figure 3 c.). The young DR⁺ rats had higher plasma TTR levels than their respective controls, and, with advancing age, there was a decline in both DR and DR⁺ rats. In contrast to RBP, hepatic TTR concentrations did not vary significantly between DR and AL rats of all ages studied (Figure 3 d.).

Liver RBP, TTR, CRBP and β -actin mRNA expression

To assess whether the low levels of liver and plasma RBP in DR rats resulted from alterations in the RBP gene expression, levels of mRNA were quantified in liver. Given the involvement of TTR and CRBP in retinoid metabolism, the levels of mRNA of those proteins were also measured in hepatic tissue. RBP, TTR, and CRBP mRNA levels were normalized for β -actin expression, to correct for differences in sample loading. Data presented in Figure 4. indicate that neither age nor diet had a significant effect on liver RBP and TTR mRNA levels. In contrast, CRBP mRNA levels were 50% higher than control levels in DR and DR⁺ rats, but only in the 22 month-old rats.

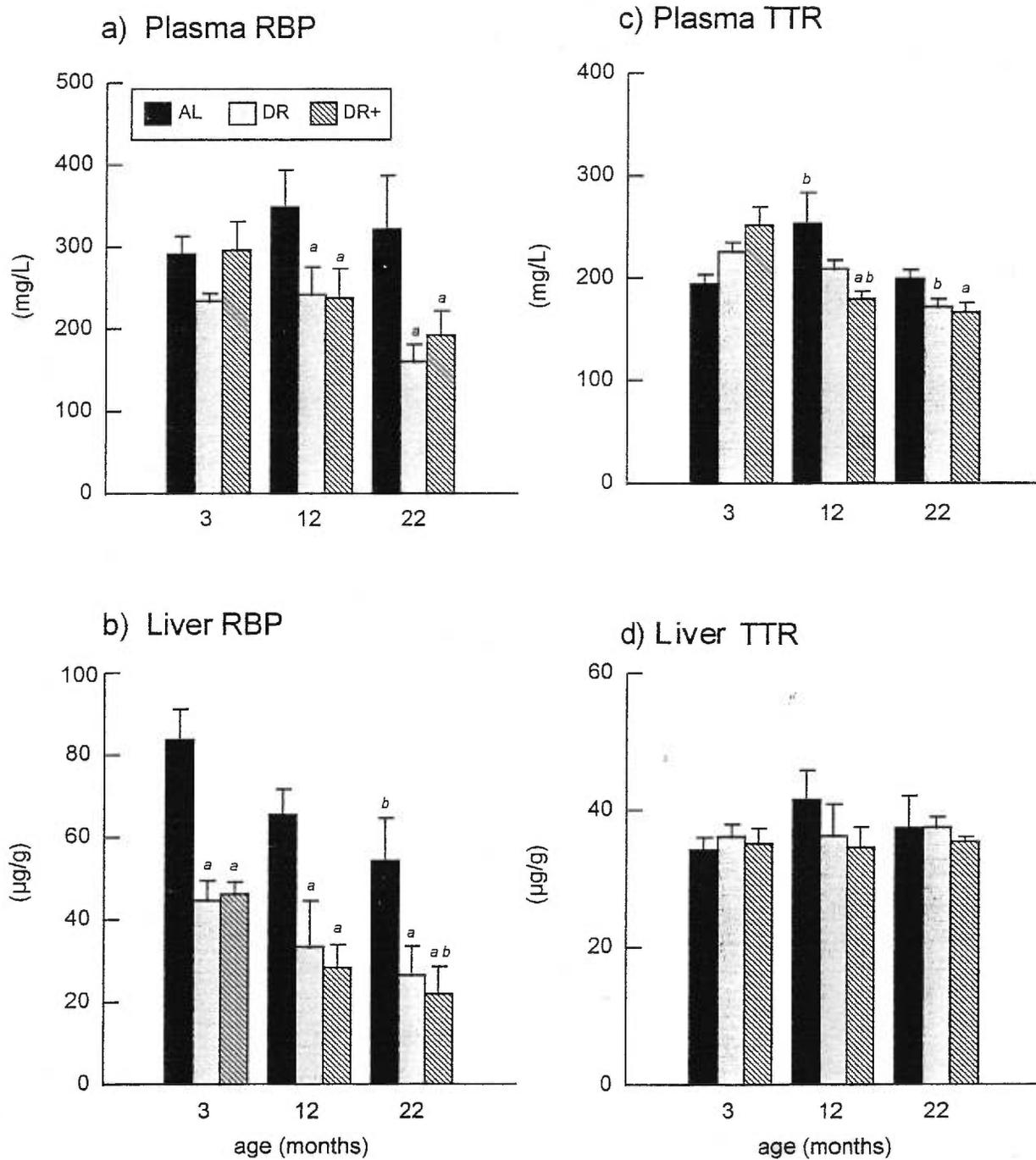


Figure 3. Effect of age and dietary restriction on plasma RBP (a), liver RBP (b), plasma TTR (c), and liver TTR (d) levels in young, mature, and old rats. Results are presented as means \pm SEM (n=4-8). Abbreviations are as in Figure 1. *a*: different from age-matched control AL group ($P < 0.05$) *b*: different from diet-matched 3 month-old group ($P < 0.05$)

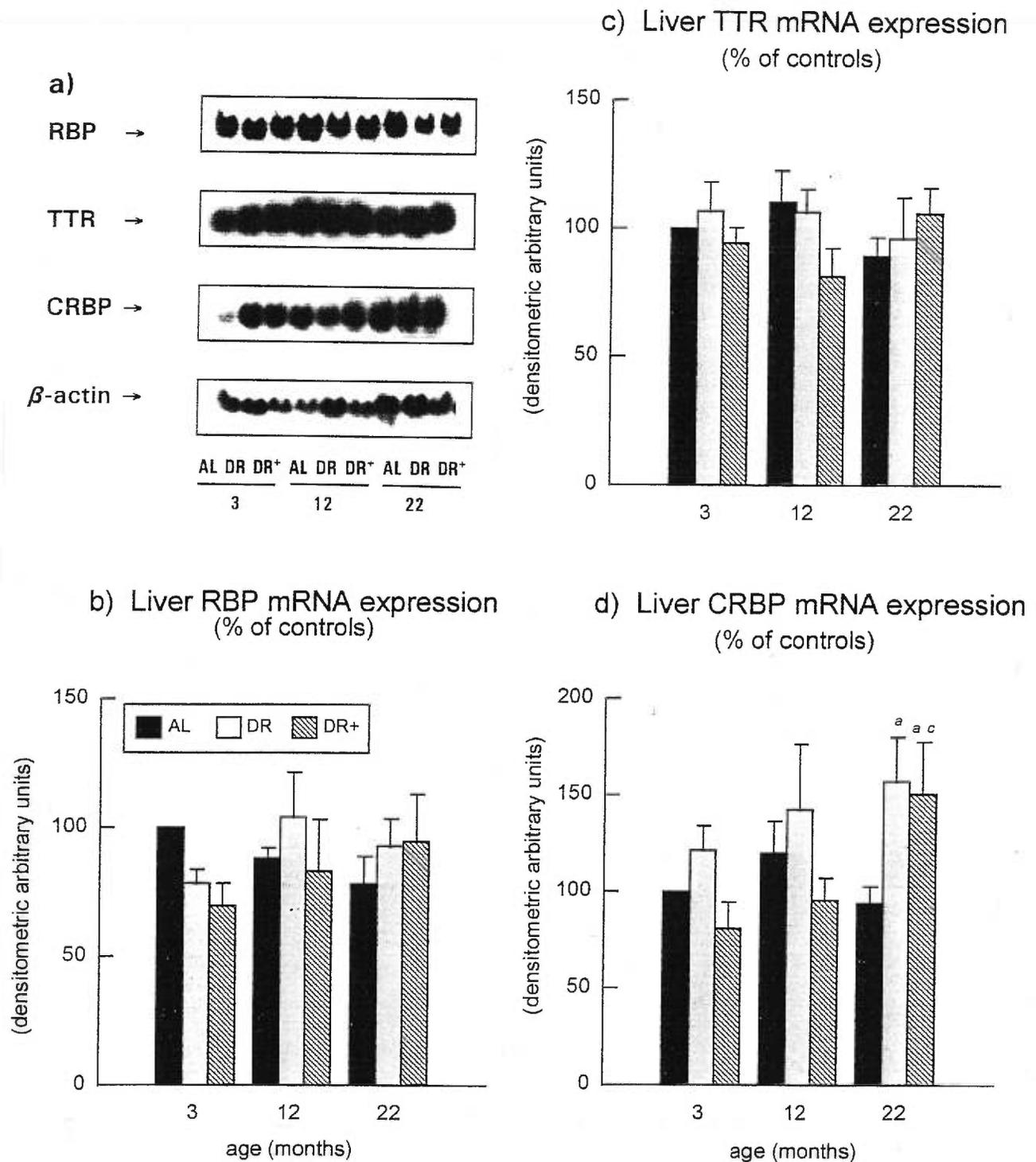


Figure 4. Effect of age and dietary restriction on liver RBP, TTR, CRBP and β -actin mRNA expression in young, mature, and old rats. One representative Northern blot per group is shown (a) for each protein. Mean level of RBP (b), TTR (c), and CRBP (d) mRNA levels are presented as a percentage of the expression of the 3 month-old AL group (controls). Each bar represents the mean \pm SEM from 3-7 rats per group. *a*: different from age-matched control AL-group ($P < 0.05$) *c*: different from diet-matched 3 and 12 month-old-group ($P < 0.05$)

DISCUSSION

The present study reports a paradoxical retinoid status in rats subjected to prolonged DR: their plasma retinol levels are significantly reduced and are paralleled by a decrease in plasma and hepatic RBP, but not TTR levels, while their retinoid tissue stores are adequate. Data also revealed that changes in plasma retinol homeostasis resulted from global energy restriction rather than reduction in the intake of specific nutrients involved in retinoid metabolism, such as vitamin A and zinc, as evidenced by a similar effect of DR and DR⁺. The protein intake of DR rats, even if reduced by 40%, still meets the recent recommendations set by the National Research Council (18) and others (19).

Some aspects of the retinol transport were explored. Two distinct proteins functioning differently in the organism, one is intracellular (CRBP) and the other circulating (RBP), are responsible for retinol transport. Within the cell of most tissues, retinol is transported by CRBP type I (CRBP type II in the intestine) which is recognized as playing key roles in retinoid metabolism and functions, by sequestering retinol and directing it to different enzymes responsible for its esterification, hydrolysis, and oxidation (20). Here, liver CRBP mRNA levels were maintained in rats subjected to DR, and even increased in the older age groups, suggesting normal intracellular metabolism of retinoids in these rats. At present, our understanding of the regulation of plasma levels of retinol is incomplete. In blood, retinol is transported by a specific protein, RBP, which binds to another protein, TTR, in a 1:1 molar ratio. Binding of holo-RBP to TTR is thought to occur after their secretion in blood, but recent evidence suggests that the binding of the two proteins could take place in the hepatocytes, and that the complex may be secreted as a whole (21). It was also postulated that TTR might play a regulatory role in the secretion of holo-RBP by the liver. Recent findings in TTR-knockout mice of decreased plasma RBP levels in parallel to elevated hepatic RBP levels tend to support the view of a blockage of RBP secretion in the absence of

TTR (7). In our model, hepatic TTR levels were maintained in DR and DR⁺ rats, and therefore may not be related to the decreased plasma retinol.

It is well established that hepatic RBP secretion is impaired by insufficient stores of vitamin A. We thus wondered if the low plasma retinol in rats subjected to DR could arise from a lack of an available ligand of RBP, i.e. free retinol, that would result from a decrease in retinyl ester hydrolase (REH) activity. To assess this hypothesis, we measured the activity of a newly described acid REH (14), enriched in the lysosomal fraction, and able to hydrolyse *in vitro* the retinyl esters contained in the lipid droplets of the rat liver stellate cells (22). Based on the observations of higher enzyme activity in cultured non-parenchymal cells and of the closeness of lysosomes and lipid droplets, as revealed by electron microscopy *in vivo* (23), it was postulated that acid REH would specifically be involved in the mobilization of vitamin A stores. Results from our study showed that there was no correlation between acid REH activity in liver homogenates and plasma retinol. An effect of DR on acid REH activity was observed only in the younger age groups, and may be attributed to the fact that DR in these growing rats was of short duration (for 2 months). That plasma retinol levels were not related to acid REH activity could tentatively be explained by the observation that all rats had sufficient retinoid liver stores and acid REH activity may only be altered under a certain threshold of marginal liver content of retinol. We also assessed a neutral bile acid-dependent REH activity (16), which has been proposed to play an important role in retinyl ester hydrolysis in the liver both in the hydrolysis of dietary (chylomicron remnants) retinyl ester and of stored hepatic retinyl ester. In our conditions, neutral REH proved to be unaffected by age or DR. The assay for this REH, measured in liver homogenates, necessitates supra-physiologic concentrations of bile salts and detergents and thus, determination of its exact relevance to *in vivo* remains uncertain. A large intra-group variability in neutral REH activity was noticed, as was previously reported in homogenates derived from a small liver sample compared to the whole liver (24). Aside from REH activity, one should consider the endogenous concentrations of hepatic free retinol. The levels of free retinol were similar between

AL and DR rats of the same age and, in all cases, free retinol levels were found in a molar excess over RBP concentrations (results not illustrated). Taken together, these observations tend to suggest that the decrease in plasma retinol in DR and DR⁺ rats does not result from a lack of hepatic free retinol. However, since retinol and RBP measurements were made in homogenates from the whole liver, we can not rule out the possibility of modifications in the distribution of these parameters among the different hepatic cell types.

Lower levels of plasma and hepatic RBP were found in DR and DR⁺ rats of mature and advanced age, suggesting alterations in RBP synthesis. However, expression of hepatic RBP mRNA was not significantly modified by either DR-diets, when compared to respective controls. Similarly, liver TTR mRNA expression as well as cRBP mRNA levels were not modified by age or diet. Recent studies showed that DR can regulate the expression of certain genes such as insulin receptor (25), cytochromes P₁-450 and P₂-450, superoxide dismutase (26) and glucose-regulated protein 78 (27), while the expression of other genes, namely that of basal heat shock protein 70, ubiquitin (28), catalase and glutathione peroxidase (26), is unaffected by the DR regimen. Thus, it appears that RBP, TTR and CRBP genes are part of the second category and do not respond to a prolonged DR.

Hepatic RBP levels were decreased with aging and to a greater extent with DR, while RBP gene expression was unaffected by these parameters. Interestingly, Imamine et al. (29) reported similar changes in a model of cholestasis induced by bile duct obstruction. They explained the low synthetic rate of RBP by modifications in the subcellular distribution of the functioning mRNA (known as the polysome membrane-bound mRNA): only 36% of the mRNA was membrane-bound in the bile-obstructed rats compared to 80% in the control rats. While their hypothesis is attractive, it could hardly explain our findings, since the effects of age and DR were specific to RBP and did not affect TTR. The discrepancy between RBP gene and protein expression suggests that RBP synthesis is impaired at the post-transcriptional level.

It is generally thought that a decline in the general turnover of hepatic and whole body proteins occurs with advancing age and that this decline would be counteracted by DR, resulting from both increased protein synthesis and breakdown (30). It may be possible that RBP degradation is enhanced in DR rats. In fact, there is some evidence of increased total protein degradation, as demonstrated in the perfused livers of male Fisher F344 DR-rats, (31) and of horseradish peroxidase and ovalbumin, in aged mice subjected to DR for 70 days (32). Because of its shorter half-life, RBP could be affected to a greater extent than is TTR, leading to reduced protein levels despite maintained synthesis.

Since retinol appears to be efficiently transported to peripheral tissues despite a 50% lower level of the main transport protein, alternative transport pathways of retinol might be considered. It was demonstrated that dietary retinyl esters contained in chylomicrons could be taken up by cultured adipocytes and that lipoprotein lipase is able to hydrolyse retinyl esters to form retinol *in vitro* (33). The post-absorptive pathway could contribute in part to the retinoid pool of extra-hepatic tissues. Interestingly, we have recently shown that adult and old DR-rats absorbed significantly more retinol via intestinal lymphatic transport than control rats eating *ad libitum* (3). Thus, it is possible that the increased lymphatic retinol absorption not only contributes to the accumulation of retinoids in hepatic tissues but also to the maintenance of adequate stores in peripheral tissues. This, in turn, would reduce the need for export of retinol-RBP from the liver, hence the lower plasma retinol levels.

The higher plasma retinoic acid levels seen in DR rats suggest a stimulation of retinol oxidation in these animals. It may be hypothesized that this higher biotransformation of retinol into its active form represents a compensatory mechanism resulting from reduced delivery of retinol-RBP. Another study, in TTR-deficient mice, reported a similar situation where very low plasma levels of retinol-RBP were associated with elevated retinoic acid levels (7). In the TTR- model, as in DR, the animals did not show any apparent sign of retinoid deficiency supporting the view of

maintenance of normal retinoid functions despite perturbation of plasma retinol homeostasis. Furthermore, in view of previous studies in which lower retinol levels were reported as a response to retinoic acid supplementation (34,35,36), it seems that plasma retinol and retinoic acid levels may be under reciprocal regulation. Finally, one may speculate that the higher levels of retinoic acid, and especially of the *9-cis* isomer, may contribute to the general beneficial effects of DR through binding to the retinoic acid receptors and regulation of gene expression.

In conclusion, we report an experimental model in which the tightly regulated transport of retinol is altered without affecting the tissue retinoid status of the animals. Since RBP gene expression is unaltered, post-transcriptional alterations and/or accelerated degradation of hepatic RBP may account for the reduced plasma RBP-retinol in rats subjected to DR. In view of the normal retinoid peripheral tissue stores, other means of retinol delivery might be considered.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the National Science and Engineering Research Council of Canada. S.C. was supported by a scholarship from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche. The authors are grateful to Roseann Piantedosi, Aline Perea, Maurice Audet, and Anne Partier for valuable technical support.

REFERENCES

1. Yu, B.P. How diet influences the aging process of the rat. 1994. *P.S.E.B.M.* **205**:97-105.
2. Ferland, G., B. Tuchweber, P.V. Bhat, and A. Lacroix. 1992. Effect of dietary restriction on hepatic vitamin A content in aging rats. *J. Gerontol.* **47**:B3-B8.
3. Chevalier, S., G. Ferland, and B. Tuchweber. 1996. Lymphatic absorption of retinol in young, mature and old rats: influence of dietary restriction. *FASEB J.* **10**:1085-1089.
4. Chevalier, S., B. Tuchweber, R. Vranckx, P.V. Bhat, and A. Lacroix. 1995. Vitamin A status in rats submitted to graded levels of dietary restriction. *Nutr. Res.* **15**:859-867.
5. Bhat, P.V. and A. Lacroix. 1983. Separation and estimation of retinyl fatty acyl esters in tissues of normal rat by high-performance liquid chromatography. *J. Chromato.* **272**:269-278.
6. Blaner W.S. 1990. Radioimmunoassays for retinol-binding-protein, cellular retinol-binding-protein, cellular retinoic acid-binding-protein. *Methods Enzymol.* **189**:270-281.
7. Wei, S., V. Episkopou, R. Piantedosi, S. Maeda, K. Shimada, M.E. Gottesman, and W.S. Blaner. 1995. Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J. Biol. Chem.* **270**:866-870.
8. Tushinski, R.J., P.M. Sussman, L.Y. Yu, and F.C. Bancroft. 1977. Pregrowth hormone messenger RNA: glucocorticoid induction and identification in rat pituitary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:2357-2361.
9. Soprano, D.R., M.L. Wyatt, J.L. Dixon, K.J. Soprano K.J., and D.S. Goodman. 1988. Retinol-binding-protein synthesis and secretion by the rat visceral yolk sac. Effect of retinol status. *J. Biol. Chem.* **263**:2934-2938.
10. Sambrook, J., E.F. Fritsh, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
11. Rajan, N., W.S. Blaner, D.R. Soprano, A. Suhara, and D.S. Goodman. 1990. Cellular retinol-binding-protein messenger RNA levels in normal and retinoid-deficient rats. *J. Lipid Res.* **31**:821-830.

12. Dorner, H., B. Fisher, G. Seefried, D. Platt, and A. Popa-Wagner. 1995. Fibronectin mRNA (FN-V95⁺) is increased in the liver of old Sprague-Dawley rats: effect of food restriction. *J. Gerontol.* **50A**:B218-B233.
13. Monaco, M.H. and S.M. Donovan. 1996. Moderate food restriction abolishes the pregnancy-associated rise in serum growth hormone and decreases serum insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations without altering IGF-1 mRNA expression in rats. *J. Nutr.* **126**:544-553.
14. Mercier, M., A. Forget, P. Grolier, and V. Azais-Braesco. 1994. Hydrolysis of retinyl esters in rat liver. Description of a lysosomal activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**:176-182.
15. Grolier, P., V. Azais-Braesco, L. Zelmire, and H. Fessi. 1992. Incorporation of carotenoids in aqueous systems: uptake by cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Acta* **1111**:135-138.
16. Cooper, D.A. 1990. Assay of liver retinyl ester hydrolase. *Methods Enzymol.* **189**:490-494.
17. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275.
18. National Research Council, National Academy of Sciences. 1995. Nutrient requirements of the laboratory rat. In: Nutrient requirements of laboratory animals, fourth revised edition, National Academy Press, Washington D.C., 173 pp.
19. Linley, L.K., K. Reynolds, M. Lentner, and S.J. Ritchey. 1995. Maintenance requirements for dietary protein in 11- and 18-month-old male rats. *J. Gerontol.* **50A**:B54-B57.
20. Ong, D.E., M.E. Newcomer, and F. Chytil. 1994. Cellular retinoid-binding proteins. In: *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medecine*. 2nd ed. Sporn M.B., A.B. Roberts, and D.S. Goodman editors, Raven Press, New York, NY, 283-317.
21. Bellovino, D., T. Morimoto, F. Tosetti, and S. Gaetani. 1996. Retinol-binding protein and transthyretin are secreted as a complex formed in the endoplasmic reticulum in HepG2 human hepatocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **222**:77-83.
22. Azais-Braesco, V., I. Dodeman, S. Delpal, M.C. Alexandre-Gouabau, A. Partier, P. Borel, and P. Grolier. 1995. Vitamin A contained in lipid droplets of rat liver stellate cells is substrate for acid retinyl ester hydrolase. *Biochim. Biophys. Acta* **1259**:271-276.

23. Enzan, H., T. Saibara, H. Ueda, S. Onishi, Y. Yamamoto, T. Okada, and H. Hara. 1991. Ultrastructural observation of Ito cells in the aged rats. In: *Cells of the Hepatic Sinusoid* vol. 3, Wisse, E., D.L. Knook, and R.S. McCuskey editors, The Kupffer Cell Foundation, Leiden, The Netherlands, pp. 226-229.
24. Blaner, W.S., J.E. Smith, R.D. Dell, and D.S. Goodman. 1985. Spatial distribution of retinol-binding protein and retinyl palmitate hydrolase activity in normal and vitamin A-deficient rat liver. *J. Nutr.* **115**:856-864.
25. Spindler, S.R., J.M. Grizzle, R.L. Walford, and P.L. Mote. 1991. Aging and restriction of dietary calories increases insulin receptor mRNA, and aging increases glucocorticoid receptor mRNA in the liver of female C3B10RF₁ mice. *J. Gerontol.* **46**:B233-B237.
26. Mote, P.L., J.M. Grizzle, R.L. Walford, and S.R. Spindler. 1991. Influence of age and caloric restriction on expression of hepatic genes for xenobiotic and oxygen metabolizing enzymes in the mouse. *J. Gerontol.* **46**:B95-B100.
27. Tillman, J.B., P.L. Mote, J.M. Dhahbi, R.L. Walford, and S.R. Spindler. 1996. Dietary energy restriction in mice negatively regulates hepatic glucose-regulated protein 78 (GRP78) expression at the posttranscriptional level. *J. Nutr.* **126**:416-423.
28. Heydari, A.R., C.C. Conrad, and A. Richardson. 1995. Expression of heat shock genes in hepatocytes is affected by age and food restriction in rats. *J. Nutr.* **125**:410-418.
29. Imamine, T., M. Okuno, H. Moriwaki, Y. Shidiji, Y. Muto, M. Seishima, A. Noma, and S. Kojima. 1996. Impaired synthesis of retinol-binding protein and transthyretin in rat liver with bile duct obstruction. *Digest. Dis. Sci.* **41**:1038-1042.
30. Ward, W. and A. Richardson. 1991. Effect of age on liver protein synthesis and degradation. *Hepatology* **14**:935-948.
31. Ward, W.F. 1988. Food restriction enhancement of the proteolytic capacity of aging rat liver. *J. Gerontol.* **43**:B121-B124.
32. Ishigami, A. and S. Goto. 1990. Effect of dietary restriction on the degradation of proteins in senescent mouse parenchymal cells in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**:362-366.

33. Blaner, W.S., J.C. Obunike, S.B. Kurlandsky, M. Al-Haideri, R. Piantedosi, R.J. Deckelbaum, and I.J. Goldberg. 1994. Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *J. Biol. Chem.* **269**:16559-16565.
34. Keilson, B., Underwood, B.A. and Loerch, J.D. 1979. Effect of retinoic acid on the mobilization of vitamin A from the liver in rats. *J. Nutr.* **109**:787-795.
35. Underwood, B.A., Loerch, J.D. and Lewis, K.C. 1979. Effect of dietary vitamin A deficiency, retinoic acid and protein quantity and quality on serially obtained plasma and liver levels of vitamin A in rats. *J. Nutr.* **109**:796-806.
36. Bhat, P.V. and A. Lacroix. 1986. Effects of retinoic acid on the metabolism of vitamin A in rat liver. *Nutr. Res.* **6**:429-435.

CHAPITRE 5. DISCUSSION GENERALE

5.1 Effets de la restriction alimentaire et de l'âge sur le poids corporel et le poids des organes

Lorsqu'on les compare aux rats nourris à volonté, les rats soumis à la DR depuis le sevrage gagnent du poids graduellement mais à un rythme plus lent, ce qui résulte en un poids corporel plus faible d'environ 50% à l'âge adulte, pour une DR de 40%. Le poids corporel final des rats est fortement corrélé au degré de restriction ($r=0.99$) (figure 1, art.I). A partir de l'âge adulte jusqu'à l'âge de 22 mois, on observe une stabilisation du poids, autant chez les rats AL que DR. Par ailleurs, le fait de consommer plus de vitamines et de minéraux par unité de poids corporel n'a eu aucun effet sur le gain de poids, tel que démontré par des poids identiques entre les rats DR et DR⁺ (tableau 1, art. III). Ceci suggère que la diète contrôle, typiquement utilisée, contient suffisamment de micronutriments pour éviter les déficiences spécifiques, même lorsqu'elle est ingérée à raison de 40% de moins qu'à volonté.

De façon générale, le poids des organes étudiés a augmenté entre 3 et 12 mois d'âge, mais est demeuré constant par la suite. Le poids du foie des rats DR et DR⁺ est significativement plus faible, mais proportionnel au poids corporel, faisant en sorte que le ratio poids du foie/poids corporel est le même que celui des rats nourris à volonté, pour un âge donné. Tandis que le poids des reins et des poumons a eu tendance à diminuer avec la restriction alimentaire, celui des intestins et du cerveau est maintenu, témoignant d'un effet spécifique de la DR, selon l'organe. Un maintien du poids et aussi de la longueur de l'intestin chez les rats soumis à la DR présente un certain intérêt, puisque ces animaux conservent une surface d'absorption relativement élevée par rapport à leur masse corporelle, suggérant un mécanisme d'adaptation à des apports alimentaires restreints (tableau 1, art. II).

5.2 Effets de la restriction alimentaire et de l'âge sur la mise en réserve hépatique et périphérique des rétinoïdes

Confirmant les résultats précédemment publiés (*Ferland et al. 1992*), la restriction alimentaire a eu pour effet de causer une accumulation des rétinoïdes au niveau du foie, avec l'avancement de l'âge. Cependant, cette accumulation ne se vérifie qu'à partir de l'âge de 12 mois, puisqu'on observe des taux hépatiques équivalents à ceux des contrôles, chez les rats DR de 3 mois (tableau 2, art.II) et de 8 mois (tableau 2, art. I). L'entreposage des rétinoïdes au niveau du foie est fortement relié, mais pas totalement expliqué par la consommation en vitamine A, chez les rats soumis à la DR. Ainsi, pour un apport quotidien en vitamine A identique à celui des rats nourris à volonté, les rats DR⁺ de 12 et 22 mois présentent des concentrations et un contenu hépatique en rétinoïdes supérieurs, alors que les rats DR, consommant 40% moins de vitamine A par jour ont un contenu hépatique en rétinoïdes inférieur. Mais la différence s'avère plus évidente si l'on compare les deux types de restriction, i.e., DR et DR⁺, car les rats soumis à l'une ou l'autre de ces diètes ont des poids corporels et des poids de foie équivalents. Ainsi, les rats DR⁺, ayant donc un apport en vitamine A relatif au foie ou au poids corporel de 40% supérieur à celui des rats DR, présentent pourtant des réserves hépatiques de 200% plus élevées (tableau 2, art.II). Ce qui suggère qu'un ou des facteurs autres que la consommation de vitamine A doit expliquer cette différence; l'absorption intestinale pourrait justement constituer un de ces facteurs. Cet aspect sera discuté plus longuement à la section 5.3.

En plus d'affecter les quantités de rétinoïdes, la restriction alimentaire semble moduler leur estérification, au niveau du foie. En effet, tandis que le rétinyl palmitate représente l'ester prédominant chez les rats contrôles, les rats DR montrent une répartition à peu près égale entre le palmitate et les autres esters, notamment, le stéarate, le linoléate et l'oléate de rétinol (tableau 3, art.I). L'enzyme spécifiquement responsable de l'estérification de quantités physiologiques de rétinol, la LRAT (*Yost et al. 1988*), utilise comme donneur endogène l'acide gras placé en position *sn*-1 de la

phosphatidylcholine membranaire (*Herr et al. 1991*). Cet acide gras, généralement saturé, est le plus souvent l'acide palmitique, ce qui concorde justement avec la prédominance de rétinyl palmitate comme forme d'entreposage, en conditions normales. La situation diffère toutefois chez les rats soumis à la restriction alimentaire. En ce sens, Laganière et Yu (*1993*) ont démontré une influence de la restriction sur la distribution des acides gras de la phosphatidylcholine membranaire, au niveau du foie. Ces auteurs n'ont malheureusement pas distingué les différents acides gras selon leur position sur la molécule de glycérol, rendant ainsi la comparaison avec nos résultats difficile. Il est tout de même possible de penser que la restriction puisse exercer son effet par une modulation des réactions enzymatiques alternées des systèmes d'élongation et de désaturation des acides gras précurseurs.

L'entreposage de rétinoïdes a aussi été étudié dans divers tissus extra-hépatiques, soient l'intestin, le rein, les poumons, le cerveau, le tissu adipeux intra-abdominal et les glandes mammaires. Chez les rats nourris à volonté, l'âge a semblé exercer un effet spécifique selon le tissu, tel que démontré par des taux croissants de rétinoïdes dans l'intestin et le rein, mais pas dans les poumons et le cerveau. A quelques exceptions près, des taux égaux ou plus élevés de rétinoïdes ont été trouvés dans les tissus des rats DR et DR⁺, par rapport aux rats nourris à volonté (tableau 2, art.II). Avec les réserves hépatiques, ces concentrations normales de rétinoïdes en périphérie témoignent non seulement d'un état nutritionnel en vitamine A adéquat, mais aussi d'un transport sanguin du rétinol efficace et ce, malgré des niveaux de rétinolémie réduits, tel qu'il sera décrit plus loin.

5.3 Absorption intestinale du rétinol

5.3.1 Effet du vieillissement

Pour tenter d'élucider l'accumulation des rétinoïdes hépatiques avec l'âge et la restriction alimentaire, l'absorption intestinale telle qu'influencée par ces deux paramètres a été étudiée, par le transport lymphatique du rétinol. Dans nos conditions,

le taux d'absorption du rétinol exprimé par 100 g de poids corporel a eu tendance à diminuer à partir de l'âge de 3 mois, chez les rats nourris à volonté, sans toutefois que cette diminution soit statistiquement significative (figure 2, art.II). Cette observation semble contraster avec les résultats rapportés par Hollander et Dadufalza (1990) qui avaient plutôt décrit une augmentation de l'absorption de la vitamine A avec l'âge. Mais tel que déjà mentionné, si leurs données avaient été considérées par unité de poids corporel, la tendance inverse aurait été trouvée. D'autres études publiées sur le sujet n'ont pas rapporté de changement dans l'absorption de cette vitamine au cours du vieillissement (Fleming et Barrows 1982, Hollander et al. 1986). En somme, on peut affirmer que l'accumulation des rétinoïdes hépatiques avec l'âge ne peut être expliquée par une absorption intestinale augmentée. Il est envisageable que l'apport alimentaire en vitamine A des rats excède leurs besoins et que ceux-ci accumulent le surplus au cours de leur vie, ou alors que l'utilisation de cette vitamine diminue avec l'âge.

La mesure de l'absorption du rétinol par voie lymphatique a permis d'apprécier l'importance du débit lymphatique, un facteur à considérer dans l'étude du transport des nutriments. Ainsi, nous décrivons ici un effet important de l'âge sur ce débit, autant chez les rats nourris à volonté que soumis à la restriction alimentaire (figure 1, art. II). Parmi les facteurs reconnus pour influencer le débit lymphatique et qui sont susceptibles d'être affectés par le vieillissement, mentionnons l'apport sanguin et l'état d'hydratation de l'interstice mucosal, les facteurs humoraux régissant la contractilité des muscles lisses vasculaires, de même que la motilité intestinale. Effectivement, le ralentissement du transit colonique chez les rats âgés a été attribué à une relâche de la musculature lisse, en réponse à une réduction de la sécrétion d'acétylcholine reliée à l'âge (Roberts et al. 1994). De plus, la diminution du niveau d'activité physique spontanée chez les rats âgés (Yu et al. 1985) pourrait aussi affecter indirectement le débit lymphatique par un ralentissement du transit intestinal. Outre ces facteurs, une réduction de la fluidité de la membrane intestinale pourrait également contribuer à la diminution du débit lymphatique avec l'âge. Des modifications de la structure et de la composition des membranes inhérentes à l'avancement de l'âge sont, en effet, bien reconnues (Yu 1990).

Une diminution de la fluidité membranaire relative au vieillissement a été décrite dans plusieurs types cellulaires (*Yu et al. 1992, Levin et al. 1992, Byun et al. 1995*). En ce qui nous concerne plus précisément, *Brasitus et al. (1984)* ont rapporté une fluidité des membranes intestinales réduite, chez des rats de 17 et 117 semaines d'âge par rapport aux rats âgés de 6 semaines.

5.3.2 Effet de la restriction alimentaire

Malgré l'effet de l'âge sur le débit lymphatique des rats soumis à la restriction alimentaire, ceux-ci ont montré un débit nettement supérieur à celui des rats nourris à volonté et ce, dès l'âge de 3 mois (figure 1, art II). Certains facteurs énumérés ci-haut sont aussi influencés par la restriction alimentaire et pourraient expliquer le débit lymphatique supérieur. Par exemple, une conservation de l'intégrité et une augmentation de la fluidité membranaire ont été observés chez des rats âgés soumis à la DR (*Laganière et Yu 1989, Yu et al. 1992, Levin et al. 1992, Byun et al. 1995*). Aussi, il est possible que la restriction alimentaire puisse prévenir la diminution de la motilité intestinale liée à l'âge, et par conséquent le débit lymphatique, en maintenant le nombre de récepteurs β -adrénergiques (*Scarpace et Yu 1987*) ainsi que l'activité physique spontanée (*Yu et al. 1985*). Par ailleurs, il est à souligner que le débit lymphatique a été influencé par une réduction globale de l'apport énergétique et non pas par l'apport en micronutriments incluant la vitamine A, tel que démontré par des débits identiques entre les rats DR et DR⁺.

Alors que la restriction alimentaire a provoqué d'importants changements dans l'absorption intestinale du rétinol, des effets différents ont été trouvés entre les deux types de DR: l'absorption a diminué avec l'âge chez les rats DR tandis qu'elle est demeurée à peu près constante chez les rats DR⁺ et donc supérieure à celle des rats AL, à tous les âges étudiés (figure 2, art.II). Considérant un même débit lymphatique chez les rats DR et DR⁺, il ressort de ces observations qu'un apport élevé en vitamine A, de façon prolongée, pourrait en augmenter l'absorption intestinale. On croit que

l'absorption du rétinol par l'entérocyte aurait lieu grâce à un transporteur spécifique de la bordure en brosse (*Dew et al. 1993*). Le rétinol est ensuite estérifié par la LRAT, en conditions physiologiques, suite à sa liaison avec la CRBP II, laquelle constitue le substrat spécifique de l'enzyme (*Yost et al. 1988*). Comme il a été démontré que le taux d'absorption et d'estérification du rétinol était directement relié à la quantité de CRBP II des entérocytes (*Lissoos et al. 1995*) et que l'expression de cette protéine est stimulée par l'acide rétinoïque (*Rajan et al. 1991*), il est possible qu'un apport élevé et prolongé en vitamine A induise l'expression de la CRBP II et, par conséquent, l'activité de la LRAT. De cette façon, l'absorption intestinale du rétinol s'en trouverait augmentée.

L'apport en phospholipides à l'entérocyte constitue un facteur additionnel à prendre en considération dans l'explication de la réponse observée chez les rats DR+. En ce sens, Ahn et Koo (*1995*) ont démontré une diminution de l'absorption du rétinol chez des rats déficients en zinc, laquelle était associée à un apport réduit en phospholipides à la muqueuse intestinale, limitant ainsi la formation des chylomicrons. Ces auteurs ont postulé que le pool réduit des phospholipides résultait d'un défaut de la sécrétion biliaire des phospholipides. Récemment, nous avons rapporté un ratio des phospholipides/acides biliaires supérieur chez les rats DR⁺ adultes et âgés à celui des rats AL et DR du même âge (*Bouchard et al. 1995*), ce qui contribue à l'absorption plus grande du rétinol des rats DR⁺.

En résumé, les résultats obtenus suggèrent que les taux hépatiques de rétinoïdes croissants avec l'âge ne peuvent être expliqués par une augmentation de leur absorption intestinale. En revanche, une amélioration de l'absorption lymphatique semble contribuer à l'accumulation des rétinoïdes hépatiques, chez les rats soumis à la restriction alimentaire, lorsque celle-ci est enrichie en vitamines et minéraux. Cette réponse semble résulter à la fois, d'une augmentation du débit lymphatique de même qu'une conservation de la surface relative d'absorption par l'apport énergétique plus faible et d'une meilleure absorption générale par un apport prolongé en vitamine A

supérieur par unité de poids corporel. Outre l'absorption intestinale, d'autres possibilités doivent être considérées pour expliquer l'accumulation des rétinoïdes au niveau du foie. Parmi celles-ci, il est possible que les rats DR présentent des besoins plus faibles en rétinol, épargnant ainsi les réserves hépatiques tout en provoquant une baisse de la rétinolémie. Ces aspects seront abordés dans les sections suivantes.

5.4 Effets de l'âge et de la restriction alimentaire sur le transport plasmatique du rétinol

Alors que les taux de rétinol plasmatiques n'ont pas été modifiés au cours du vieillissement, la situation est tout autre avec la restriction alimentaire. En effet, les rats soumis à la restriction présentent un état nutritionnel en vitamine A plutôt paradoxal: leur rétinolémie est significativement réduite, tandis que les réserves hépatiques et tissulaires sont adéquates (figure 1, tableau 1, art.III). Une pareille diminution de la rétinolémie a aussi été mise en évidence chez des rats, mâles et femelles, soumis à la DR seulement à partir de l'âge adulte (voir annexe II). Parallèlement au rétinol, les taux de RBP plasmatique, mais aussi hépatiques, sont diminués par la restriction, sans que les niveaux de la TTR ne soient affectés (figure 3, art III). Les résultats indiquent aussi que ces changements dans l'homéostasie du rétinol sanguin résultent d'une restriction énergétique globale, plutôt que d'une réduction de l'apport en nutriments reconnus pour affecter l'état en rétinoïdes, tels que la vitamine A et le zinc, comme le démontrent les résultats similaires entre les rats DR et DR⁺. Soulignons encore que, malgré leurs faibles taux de rétinol sanguins, normalement indicatifs d'une déficience en vitamine A, non seulement les rats en restriction ne présentent aucun signe d'une telle déficience mais encore, ils vivent plus longtemps démontrant moins de pathologies que leurs contrôles nourris à volonté.

5.4.1 Protéine intracellulaire de transport (CRBP I)

Dans le but de comprendre la baisse de la rétinolémie observée avec la restriction, plusieurs aspects relatifs au transport du rétinol ont été explorés. Deux protéines

spécifiques sont impliquées dans le transport du rétinol dans l'organisme, mais fonctionnent différemment, l'une étant intracellulaire (CRBP) et l'autre, circulante (RBP). La CRBP de type I, présente dans la plupart, sinon toutes les cellules, agit comme véhicule du rétinol à l'intérieur des cellules (CRBP II, dans l'intestin). Elle est aussi reconnue pour assurer des fonctions d'importance dans le métabolisme du rétinol, en le séquestrant et le dirigeant vers les diverses enzymes responsables de son estérification, hydrolyse et oxydation. La CRBP, selon qu'elle est liée ou non au rétinol, agit directement comme substrat pour certaines de ces enzymes alors qu'elle peut en inhiber d'autres (Ong et al. 1994). Dans la présente étude, les taux d'ARNm de CRBP hépatique étaient maintenus chez les rats soumis à la DR, et même légèrement augmentés dans les groupes d'âge plus avancé, témoignant d'un métabolisme cellulaire apparemment normal chez ces animaux (figure 4, art.III).

5.4.2 Transthyrétine (TTR)

Jusqu'à présent, notre compréhension de la régulation de la rétinolémie reste incomplète. Dans le sang, le rétinol est transporté par la RBP, laquelle lie aussi une autre protéine, la TTR, dans un ratio molaire de 1. Il est généralement assumé que la liaison de la RBP-rétinol à la TTR surviendrait suite à leur sécrétion dans la circulation, mais de récentes observations suggèrent plutôt que la liaison des deux protéines aurait lieu dans l'hépatocyte et le complexe serait ainsi sécrété (*Bellovino et al. 1996*). Dans le même optique, il a été postulé que la TTR occuperait une fonction modulatrice de la sécrétion de la RBP-rétinol par le foie. Chez des souris rendues déficientes en TTR, par mutagenèse dirigée, des taux très faibles de rétinol sanguin ont été trouvés parallèlement à des taux de RBP hépatiques supérieurs à ceux des souris normales, appuyant un blocage de la sécrétion de RBP-rétinol, en l'absence de TTR (*Wei et al. 1995*). Dans nos modèles de restriction alimentaire, DR et DR⁺, les niveaux de TTR hépatiques ont été maintenus et ne peuvent donc être associés à la baisse du rétinol sanguin (figure 3, art. III).

Il est à souligner que les niveaux plasmatiques de TTR sont reconnus pour diminuer lors de malnutrition protéino-énergétique et servent justement de marqueurs biochimiques de cette condition (Gibson 1990). LeMoullac et al. (1992) ont aussi rapporté une baisse de TTR sanguine et d'ARNm de TTR hépatique dans le modèle expérimental de restriction alimentaire chez le rat, contrastant ainsi avec nos résultats. Cependant, cette étude de DR à court terme révèle que la diminution immédiate de la TTR sanguine est suivie d'un retour à des valeurs presque basales, après 28 jours de restriction alimentaire. Il est possible que les taux de TTR soient modulés en début de restriction et retournent à la normale dans des conditions à long terme, par mécanisme d'adaptation.

5.4.3 Rétinyl ester hydrolases (REH)

Il est depuis longtemps admis que la sécrétion hépatique de la RBP est compromise par des réserves insuffisantes en vitamine A. Par conséquent, nous avons voulu savoir si la baisse de la rétinolémie des rats en restriction pourrait provenir d'un manque de disponibilité du ligand de la RBP, en l'occurrence, le rétinol, qui serait la conséquence d'une diminution de l'activité de la REH. Afin de vérifier cette hypothèse, l'activité de la REH acide, décrite récemment, a été mesurée (*Mercier et al. 1994*). Cette enzyme dont l'activité se retrouve particulièrement dans la fraction lysosomale, est en mesure d'hydrolyser les rétinyl esters contenus dans les gouttelettes lipidiques des cellules étoilées isolées de foies de rats, *in vitro* (*Azais-Braesco et al. 1995*). Considérant une plus forte activité de l'enzyme en question dans les cellules non-parenchymateuses ainsi que la proximité des lysosomes et des gouttelettes lipidiques, telle que démontrée par microscopie électronique (*Enzan et al. 1994*), il a été postulé que cette REH acide serait impliquée dans la mobilisation des réserves de rétinoïdes. Cependant, les résultats de ce travail ne présentent aucune corrélation entre l'activité de la REH acide dans les homogénats de foie et les taux de rétinol plasmatique (figure 2, art.III). On peut tenter d'expliquer ceci par le fait que les réserves hépatiques de rétinoïdes étaient adéquates pour tous les rats et qu'il est possible que l'activité de la

REH acide ne soit altérée que lorsque le contenu hépatique tombe sous un seuil critique. Le seul effet de la restriction alimentaire sur l'activité de cette enzyme a été noté chez les jeunes rats, et pourrait ainsi être expliqué par la restriction de courte durée (2 mois) chez ces animaux en croissance. Il est envisageable, en effet, que l'activité de l'enzyme réagisse à la DR dans les premières semaines et retourne à la normale par la suite.

Additionnellement, nous avons fait la mesure de l'activité d'une REH dépendante des acides biliaires, agissant à pH neutre, qui serait impliquée à la fois dans l'hydrolyse des rétinyl esters des chylomicrons et de ceux entreposés dans le foie (*Cooper 1990*). Dans nos conditions, cette activité enzymatique n'a été influencée ni par l'âge, ni par la restriction alimentaire. La mesure de cette REH, effectuée dans les homogénats de foie, nécessite la présence de concentrations supra-physiologiques de sels biliaires et de détergents, ce qui entache quelque peu sa pertinence, *in vivo*. Par ailleurs, l'activité de l'enzyme présente une grande variabilité individuelle précédemment mise en évidence autant dans des homogénats dérivés d'un échantillon de foie que du foie total (*Blaner et al. 1985b*). Ayant exclu deux activités REH, il est encore probable qu'une autre REH soit mise en cause, notamment, la REH indépendante des acides biliaires, stimulée par l'apo-CRBP (*Boerman et Napoli 1991*). Mais, mise à part l'activité des REH, les concentrations endogènes de rétinol libre devraient être prises en considération. Chez les rats DR âgés de 8 mois, un ratio rétinol/esters a été noté si bien qu'un effet de la REH avait alors été soupçonné (tableau 3, art.I). Chez les rats de 12 et 22 mois, les taux de rétinol libre se sont avérés égaux entre les rats nourris à volonté et les rats DR et DR⁺ du même âge mais surtout, ces taux se retrouvaient en excès molaire par rapport à la RBP, dans tous les cas. Dans l'ensemble, ces observations suggèrent que la diminution de la rétinolémie vue chez les rats soumis à la restriction alimentaire n'est pas la conséquence d'un manque de rétinol libre. Nous ne pouvons cependant exclure la possibilité de modifications dans la distribution subcellulaire du rétinol et de la RBP puisque les mesures ont été effectuées dans l'homogénat de foie total.

5.4.4. Protéine de transport plasmatique du rétinol (RBP)

Les rats adultes et âgés soumis à l'une ou l'autre des diètes DR ont présenté des niveaux réduits de RBP plasmatique et hépatique, par rapport aux rats contrôles du même âge, suggérant une perturbation de la synthèse de la RBP (figure 3, art.III). En revanche, les taux d'ARNm de la protéine n'ont pas été modifiés par la restriction. D'ailleurs, ni l'âge, ni la diète n'a exercé d'effet significatif sur l'expression des ARNm de TTR et de CRBP (figure 4, art.III). De récentes études ont mis en évidence la régulation de certains gènes par la DR, tels que le récepteur à l'insuline (*Spindler et al. 1991*), les cytochromes P₁-450 et P₂-450, la superoxyde dismutase (*Mote et al. 1991*) et la protéine 78 modulée par le glucose (*Tillman et al. 1996*) alors que l'expression d'autres gènes comme la protéine 70 de choc thermique, l'ubiquitine (*Heydari et al. 1995*), la catalase et la glutathion peroxydase (*Tillman et al. 1996*) n'est pas affectée par la DR. Il semble donc que les gènes de la RBP, la TTR et la CRBP font partie de la seconde catégorie et ne répondent pas à la restriction alimentaire, du moins à long terme.

Les taux hépatiques de la RBP ont diminué avec l'âge, et de façon plus marquée avec la DR, sans que l'expression du gène de la RBP ne soit affectée par ces conditions. *Imamine et al. (1995)* ont rapporté une situation semblable dans un modèle de cholestase induite par ligature du cholédoque. Ces auteurs ont tenté d'expliquer le taux de synthèse réduit de la protéine par des modifications dans la distribution cellulaire de l'ARNm fonctionnel, en l'occurrence, l'ARNm des polysomes liés à la membrane. Alors que 80% de l'ARNm se trouvait dans la fraction des polysomes liés à la membrane chez les rats contrôles, seulement 36% de l'ARNm des rats ligaturés s'y retrouvait. Bien que leur hypothèse soit attrayante, elle peut difficilement s'appliquer à nos résultats, puisque l'âge et la DR ont exercé des effets spécifiques à la RBP et n'ont pas influencé la TTR. Par ailleurs, il est peu probable que la perturbation de la synthèse de la RBP résulte d'un simple manque de l'apport protéique alimentaire, puisque même si réduit de 40%, l'apport en protéines des rats DR et DR⁺ rencontre

encore les besoins nutritionnels de ces animaux (National Research Council 1995, Linley et al. 1995). La divergence entre l'expression du gène et de la protéine RBP suggère donc une perturbation de sa synthèse au niveau post-transcriptionnel.

Il est généralement admis que le turnover protéique, dans le foie et l'organisme en entier, subit un déclin avec l'âge, lequel serait contrecarré par la DR. En effet, la DR aurait pour effet d'augmenter à la fois, la synthèse et la dégradation protéique (*Ward et Richardson 1991*). En fait, une augmentation de la dégradation protéique totale a été démontrée, en système de foie perfusé, chez des rats F344 en restriction alimentaire (*Ward 1988*) de même qu'une dégradation accrue de la peroxydase de raifort et de l'ovalbumine hépatiques, chez des souris âgées soumises à une DR de 70 jours (*Ishigami et Goto 1990*). Il est donc possible que la dégradation de la RBP soit accentuée chez les rats soumis à la DR. De par sa plus courte demie-vie, il se peut que la RBP soit particulièrement affectée, par opposition à la TTR, menant ainsi à des taux protéiques réduits malgré une conservation de sa synthèse normale.

5.4.5 Voies alternatives

Malgré une diminution de près de 50% de la rétinolémie, le rétinol semble tout de même transporté de façon efficace jusqu'aux tissus périphériques, ce pourquoi, des voies de transport alternatives peuvent être envisagées. En ce sens, il a été démontré que des adipocytes en culture pouvaient capter les rétinyl esters contenus dans les chylomicrons et que la lipoprotéine lipase a la capacité d'hydrolyser les rétinyl esters pour former du rétinol, *in vitro* (*Blaner et al. 1994*). Or, cette voie pourrait contribuer, en partie, à fournir des rétinoïdes aux réserves extra-hépatiques. Tel que mentionné à la section 5.3.2, les rats adultes et âgés soumis à la DR absorbent davantage de rétinol par la voie lymphatique intestinale que les contrôles nourris à volonté. Il est alors plausible que cette augmentation de l'absorption intestinale du rétinol contribue, non seulement à l'accumulation des rétinoïdes hépatiques mais aussi aux réserves en rétinoïdes des tissus périphériques. Par conséquent, cet apport en rétinol amenuiserait

le besoin d'en exporter du foie, résultant en des taux plasmatiques de rétinol-RBP réduits.

5.4.6 Modulation par l'acide rétinoïque

L'analyse des niveaux sanguins d'acide rétinoïque chez des rats âgés soumis à la DR à partir de l'âge adulte (8 mois) a révélé des taux nettement supérieurs à ceux des rats nourris à volonté (voir annexe II). Les résultats obtenus des rats adultes et âgés de la présente étude viennent confirmer ces observations: les rats DR et DR⁺ présentent des taux plasmatiques d'acide rétinoïque total (*trans*, 13-*cis* et 9-*cis*) de 3 à 4 fois ceux des rats contrôles. De plus, le 9-*cis* acide rétinoïque, le ligand des RXR_s, est retrouvé en quantités égales ou supérieures au *trans*-acide rétinoïque dans le plasma des rats adultes et âgés soumis à la DR, alors que ce métabolite est pratiquement indétectable chez les rats AL. Un taux plus élevé d'oxydation du rétinol en acide rétinoïque semble le résultat d'une réduction de l'apport énergétique plutôt que de différences dans l'apport ou l'état nutritionnel en vitamine A, car les rats DR et DR⁺ présentent des profils d'acide rétinoïque semblables.

Une biotransformation supérieure du rétinol en acide rétinoïque au niveau cellulaire, serait possiblement attribuée à l'induction des enzymes impliquées dans cette voie, sous l'influence de la DR. L'augmentation de la synthèse d'acide rétinoïque pourrait refléter une adaptation à l'apport cellulaire réduit en rétinol, suite au défaut de synthèse de la RBP engendré par la DR. Une situation semblable a justement été démontrée chez des souris n'exprimant pas la TTR, qui présentent des taux sanguins réduits de rétinol-RBP, mais pas de signes de déficience en vitamine A (Wei *et al.* 1995). L'élévation des taux sanguins d'acide rétinoïque obtenu par la restriction alimentaire confirme, par ailleurs, l'effet d'épargne des réserves de rétinoïdes et la baisse de la rétinolémie précédemment rapportés dans d'autres conditions, où l'acide rétinoïque était administré oralement (Bhat *et Lacroix* 1986) ou dérivé du β -carotène infusé dans l'intestin (Wang *et al.* 1993).

Si l'on réfère à la littérature et aux modèles (figures 4 et 5) présentés au chapitre premier, les taux sanguins élevés d'acide rétinoïque pourrait expliquer plusieurs résultats obtenus dans cette étude. Parmi ceux-ci, mentionnons l'induction de l'activité de la LRAT et de l'expression de la CRBP II, favorisant la voie d'estérification dans le foie et l'absorption intestinale du rétinol, respectivement, deux situations retrouvées chez les rats soumis à la restriction alimentaire. A titre spéculatif, les niveaux sanguins supérieurs d'acide rétinoïque et particulièrement, de 9-*cis*-acide rétinoïque, pouvant contribuer aux pools tissulaires (*Kurlandsky et al. 1996*) pourraient expliquer certains effets bénéfiques de la DR par la régulation de l'expression des gènes.

En plus des effets sur le métabolisme des rétinoïdes, nous avons démontré une amélioration de la fonction biliaire par la restriction alimentaire (voir annexe II). En effet, alors que les rats nourris à volonté voient leur sécrétion biliaire diminuer au cours du vieillissement, celle des rats DR reste constante. Une sécrétion accrue de glutathion semble constituer un élément majeur dans l'amélioration de la formation et de la sécrétion biliaire des rats DR. Cette plus grande disponibilité du glutathion au niveau des voies biliaires et de la lumière intestinale pourrait contribuer à certains effets bénéfiques de la DR. Par ses propriétés anti-oxydantes, le glutathion pourrait neutraliser les radicaux libres du tractus digestif et ainsi participer à l'action inhibitrice de la DR sur la carcinogénèse, à ce niveau.

En résumé, ces travaux décrivent la modulation, par une simple intervention nutritionnelle, du transport plasmatique du rétinol, sans que l'état des réserves tissulaires de rétinoïdes ne soient affectées. Comme l'expression du gène de la RBP ne semble pas modifié par la restriction alimentaire, des perturbations au niveau post-transcriptionnel ou alors, une dégradation accélérée de la protéine pourraient être à l'origine des taux sanguins réduits de RBP-rétinol, chez les rats soumis à la DR. D'autres voies de transport du rétinol sont à envisager dans l'explication des réserves périphériques normales de rétinoïdes de ces animaux.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats rapportés dans le présent travail peut être résumé en termes d'effets du vieillissement d'une part, et d'effets de la restriction alimentaire, d'autre part. Confirmant des résultats antérieurs, le vieillissement a provoqué une accumulation des rétinoïdes, au niveau du foie. Cette accumulation, ne pouvant être expliquée par une augmentation de l'absorption intestinale du rétinol, pourrait provenir d'une utilisation réduite de la vitamine A suite à une diminution des besoins cellulaires, avec l'avancement de l'âge. Sans modifier significativement l'absorption lymphatique du rétinol (bien qu'entraînant une tendance à la baisse), le vieillissement a eu pour effet de ralentir le débit lymphatique. Cette observation sous-tend des répercussions plus larges et devrait ainsi être considérée dans l'absorption intestinale d'autres nutriments ou médicaments liposolubles qui empruntent aussi la voie lymphatique. Un autre effet notable du vieillissement est la diminution progressive des taux de RBP hépatiques, sans toutefois, que le transport sanguin du rétinol ne s'en trouve compromis, chez les rats âgés.

La restriction alimentaire a, pour sa part, entraîné des effets importants à divers niveaux du métabolisme des rétinoïdes. Dans un premier temps, un contenu hépatique de rétinoïdes supérieur à celui des rats nourris à volonté a été trouvé chez les rats soumis à la DR⁺ et ne peut être entièrement attribué à une plus grande consommation de vitamine A, relative au poids corporel. Mais, une augmentation de l'absorption intestinale du rétinol, peut expliquer, du moins en partie, cette accumulation des rétinoïdes au niveau du foie des rats DR⁺. Le débit lymphatique supérieur observé tant chez les rats DR que DR⁺ constitue un des mécanismes contribuant à l'absorption intestinale plus élevée chez ces animaux. Il est aussi suggéré que l'apport prolongé en vitamine A supérieur, relativement au poids corporel, chez les rats DR⁺, serait à l'origine de leur meilleure absorption intestinale de rétinol, en induisant l'expression de la CRBP II et l'estérification du rétinol dans l'entérocyte.

Dans un deuxième temps, les rats soumis à la restriction alimentaire (DR et DR⁺) ont présenté des taux de rétinol-RBP sanguins considérablement réduits, normalement indicatifs d'une déficience en vitamine A, alors que leurs réserves hépatiques et périphériques en rétinoïdes sont adéquates et dans certains cas, voire même augmentées. Cette diminution de la rétinolémie n'a pu être associée à un effet de la DR sur les taux de TTR sanguins, ni sur l'activité des REH neutre et acide évaluées dans le foie. Cependant, les taux de RBP hépatiques ont été diminués, donc corrélés à la réduction des taux sanguins de rétinol-RBP, suggérant fortement une perturbation de la synthèse hépatique de la protéine. En revanche, les taux d'ARNm de RBP n'ont pas été affectés par la DR. Cette divergence entre l'expression du gène et de la protéine RBP suggère une altération de sa synthèse au niveau post-transcriptionnel ou alors, une dégradation accélérée de la protéine. Dans les deux cas, cet effet de la DR serait spécifique à la RBP puisque ni les taux hépatiques d'ARNm, ni de la protéine TTR n'ont été modulés par la DR.

En regard des concentrations tissulaires périphériques adéquates des rats soumis à la restriction alimentaire, il semblerait que le rétinol soit tout de même transporté efficacement chez ces animaux, malgré leurs taux sanguins réduits. Ceci laisse envisager des voies de transport autres que celle qui implique la RBP-TTR, telle que la voie des chylomicrons véhiculant les rétinyl esters suite à l'absorption intestinale. Il est possible que cette voie participe non seulement à l'accumulation des rétinoïdes au niveau hépatique, mais aussi en périphérie.

Finalement, les rats soumis à la restriction alimentaire ont présenté des taux sanguins d'acide rétinoïque supérieurs à ceux des rats contrôle, laissant ainsi supposer une biotransformation du rétinol en acide rétinoïque. L'élévation des taux sanguins d'acide rétinoïque aurait pour conséquences, entre autres, d'épargner les réserves tissulaires de rétinoïdes, de provoquer une baisse de la rétinolémie et expliquerait plusieurs effets exercés par la DR sur le métabolisme des rétinoïdes, observés au cours de ces études. La production accrue d'acide rétinoïque, en particulier, du métabolite 9-*cis* acide

rétinoïque (combinée à la sécrétion biliaire élevée de glutathion) pourraient être reliés aux actions bénéfiques de la restriction alimentaire. Ce modèle, simple et reproductible, offre donc plusieurs perspectives de recherche d'intérêt, dont l'étude du métabolisme des rétinoïdes et de leurs fonctions.

BIBLIOGRAPHIE

- Ahn J., Koo S.I. Effects of zinc and essential fatty acid deficiencies on the lymphatic absorption of vitamin A and secretion of phospholipids. *J. Nutr. Biochem.* **6**:595-603, 1995.
- Aldeman R.C., Roth G.S. eds. Testing the theories of aging. CRC Press, Boca Raton, FL, 1982.
- Anderson K.B., Nillson A., Blomhoff H.K., Oyen T.B., Gabrielsen O.S., Norum K.R., Blomhoff R. Direct mobilization of retinol from perisinusoidal stellate cells to plasma. *J. Biol. Chem.* **267**:1340-1344, 1992.
- Åström A., Tavakkol A., Pettersson U., Cromie M., Elder J.T. Voorhees J.J. Molecular cloning of two human cellular retinoic acid-binding proteins (CRABP). *J. Biol. Chem.* **266**:17662-17666, 1991.
- Azais-Braesco V., Dodeman I., Delpal S., Alexandre-Gouabau M.C., Partier A., Grolier P. Vitamin A contained in lipid droplets of rat stellate cells is a substrate for acid retinyl ester hydrolase. *Biochim. Biophys. Acta* **1259**:271-276, 1995.
- Batres R.O., Olson J.A. A marginal vitamin A status alters the distribution of vitamin A among parenchymal cells in rat liver. *J. Nutr.* **117**:874-879, 1987.
- Båvik C.O., Eriksson U., Allen R.A., Petersson P.A. Identification and partial characterization of a retinal pigment epithelium membrane receptor for plasma retinol-binding protein. *J. Biol. Chem.* **266**:14978-14985, 1991.
- Båvik C.O., Busch C., Eriksson U. Characterization of a plasma retinol-binding protein membrane receptor expressed in the retinal pigment epithelium. *J. Biol. Chem.* **267**:23035-23042, 1992.
- Beauchene R.E., Bales C.W., Bragg C.S., Hawkins S.T., Mason R. L. Effect of age of initiation of feed restriction on growth, body composition, and longevity of rats. *J. Gerontol.* **41**:13-19, 1986.
- Bellovino D., Morimoto T., Tosetti F., Gaetani S. Retinol-binding protein and transthyretin are secreted as a complex formed in the endoplasmic reticulum in HepG2 human hepatocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **222**:77-83, 1996.
- Berg B.N., Simms H.S. Nutrition and longevity in the rat. II. Longevity and onset of disease with different levels of intake. *J. Nutr.* **71**: 255-263, 1960.

- Berni R., Stoppini M., Zapponi M.C., Meloni M.L., Monaco H.L., Zanotti G. The bovine plasma retinol-binding protein: amino acid sequence, interaction with transthyretin, crystallization and preliminary X-ray data. *Eur. J. Biochem.* **192**:507-513, 1990.

- Berni R., Stoppini M., Zapponi G. The piscine plasma retinol-binding protein: purification, partial amino acid sequence and interaction with mammalian transthyretin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) retinol-binding protein. *Eur. J. Biochem.* **201**:99-106, 1991.

- Bertrand H.A., Lynd F.T., Masoro E.J., Yu B.P. Changes in adipose mass and cellularity through the adult life of rats fed ad libitum of a life-prolonging restricted diet. *J. Gerontol.* **42**:827-835, 1980.

- Bhat, P.V., Lacroix A., Effects of retinoic acid on the metabolism of vitamine A in rat liver. *Nutr. Res.* **6**:429-435, 1986.

- Bhat P.V., Jetten A.M. Metabolism of all-*trans*-retinol and all-*trans*-retinoic acid in rabbit tracheal epithelial cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* **922**:18-27, 1987.

- Bhat P.V., Lacroix A. Effects of retinoic acid on the concentrations of radioactive metabolites of retinol in tissues of rats maintained on a retinol-deficient diet. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **69**:826-830, 1991.

- Birchenall-Sparks M.C., Roberts M.S., Staecker J., Hardwick J.P., Richardson A. Effect of dietary restriction on liver protein synthesis in rats. *J. Nutr.* **115**:944-950, 1985.

- Black D.A., Heduan E., Mitchell D. Hepatic stores of retinol and retinyl esters in elderly people. *Age Ageing* **17**:337-342, 1988.

- Blaner W.S., Hendriks H.F.J., Brouwer A., de Leeuw A.M., Knook D.L., Goodman D.S. Retinoids, retinoid-binding proteins, and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J. Lipid Res.* **26**:1241-1251, 1985a.

- Blaner W.S., Smith J.E., Dell R.D., Goodman D.S. Spatial distribution of retinol-binding protein and retinyl palmitate hydrolase activity in normal and vitamin A-deficient rat liver. *J. Nutr.* **115**:856-864, 1985b.

- Blaner W.S. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr. Rev.* **10**:308-316, 1989.

- Blaner W.S., van Bennekum A.M., Brouwer A., Hendriks H.F.J. Distribution of lecithin-retinol acyltransferase activity in different types of rat liver cells and subcellular fractions. *FEBS Lett.* **274**:89-92, 1990.
- Blaner W.S., Olson J.A. Retinol and retinoic acid metabolism. In: The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine. 2nd ed., M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman eds., Raven Press, New York, NY, 1994.
- Blaner W.S., Obunike J.C., Kurlandsky S.B., Al-Haideri M., Piantedosi R., Deckelbaum R.J., Goldberg I.J. Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *J. Biol. Chem.* **269**:16559-16565, 1994.
- Blomhoff R., Holte K., Naess L., Berg T. Newly administered [³H]retinol is transferred from hepatocytes to stellate cells in liver for storage. *Exp. Cell Res.* **150**:186-193, 1984.
- Blomhoff R., Rasmussen M., Nilsson A., Norum K.R., Berg T., Blaner W.S., Kato M., Mertz J.R., Goodman D.S., Eriksson U., Peterson P.A. Hepatic retinol metabolism: Distribution of retinoids, enzymes and binding proteins in isolated rat liver cells. *J. Biol. Chem.* **260**: 13560-13565, 1985.
- Blomhoff, R., Berg T., Norum K.R. Transfer of retinol from parenchymal to stellate cells in liver is mediated by retinol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:3455-3458, 1988.
- Blomhoff, R., Green, M., Balmer Green, J., Berg, T., Norum, K.R. Vitamin A metabolism: New perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol. Rev.* **71**:951-990, 1991.
- Boerman M.H.E.M., Napoli J.L. Cholate-independent retinyl ester hydrolysis: Stimulation by apo-cellular retinol-binding protein. *J. Biol. Chem.* **266**:22273-22278, 1991.
- Boerman M.H.E.M., Napoli J.L. Characterization of a microsomal retinol dehydrogenase: a short-chain alcohol dehydrogenase with integral and peripheral membrane forms that interacts with holo-CRBP (type I). *Biochemistry* **34**:7027-7037, 1995.
- Boerman M.H.E.M., Napoli J.L. Cellular retinol-binding protein-supported retinoic acid synthesis: relative roles of microsomes and cytosol. *J. Biol. Chem.* **271**:5610-5616, 1996.

- Bouchard G., Chevalier S., Perea A., Yousef I.M., Tuchweber B. Beneficial effect of dietary restriction on bile formation in aging rats: evidence for a role of glutathione. *Gastroenterology* **108**:A717, 1995.
- Boylan J.F., Gudas L.K. Overexpression of the cellular retinoic acid-binding protein I (CRABP-I) results in a reduction in differentiation-specific gene expression in F9 teratocarcinoma cells. *J. Cell Biol.* **112**:956-969, 1991.
- Boylan J.F., Gudas L.K. The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-*trans*-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J. Biol. Chem.* **267**:21486-21491, 1992.
- Brasitus T.A., Yeh K.Y., Holt P.R., Schachter D. Lipid fluidity and composition of intestinal microvillus membranes isolated from rats of different ages. *Biochim. Biophys. Acta* **778**:341-348, 1984.
- Buck J., Ritter G., Dannecker L., Katta V., Cohen S.L., Chait B.T., Hämmerling U. Retinol is essential for growth of activated human B cells. *J. Exp. Med.* **171**:1613-1624, 1990.
- Buck J., Myc A., Garbe A., Cathomas G. Differences in the action and metabolism between retinol and retinoic acid in B lymphocytes. *J. Cell Biol.* **115**:851-859, 1991a.
- Buck J., Derguini F., Levi E., Nakanishi K., Hämmerling U. Intracellular signaling by 14-hydroxy-4,14-retroretinol. *Science* **254**:1654-1656, 1991b.
- Byun D.S., Venkatraman J.T., Yu B.P., Fernandes G. Modulation of antioxidant activities and immune response by food restriction in aging Fisher-344 rats. *Aging* **7**:40-48, 1995.
- Carney S.M., Underwood B.A., Loerch J.D. Effects of zinc and vitamin A deficient diets on the hepatic mobilization and urinary excretion of vitamin A in rats. *J. Nutr.* **108**:1432-1438, 1978.
- Chai X., Zhai Y., Popescu G., Napoli J.L. Cloning of a cDNA for a second retinol dehydrogenase, type II: expression of its mRNA relative to type I. *J. Biol. Chem.* **270**:28408-28412, 1995.
- Chai X., Zhai Y., Napoli J.L. Cloning of a cDNA encoding a retinol dehydrogenase isozyme type III. *Gene* **169**:219-222, 1996.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**:940-954, 1996.

- Cheney K.E., Liu R.k., Smith G.S., Meredith P.J., Mickey M.R., Walford R.L. The effect of dietary restriction of varying duration on survival, tumor patterns, immune function, and body temperature in B10C3F₁ mice. *J. Gerontol.* **38**:420-430, 1983.
- Chevalier S., Tuchweber B., Bhat P.V., Lacroix A. Dietary restriction reduces the incidence of NMU-induced mammary tumors and alters retinoid tissue concentrations in rats. *Nutr. Cancer* **20**:187-196, 1993.
- Chevalier S., Tuchweber B., Bhat P.V., Lacroix A. Vitamin A status in rats submitted to graded levels of dietary restriction. *FASEB J.* **7**:A304, 1993.
- Colantuoni V., Romano V., Bensi G., Santoro C., Costanzo F., Raugei G., Cortese R. Cloning and sequencing of a full length cDNA coding for human retinol-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **11**:7769-7776, 1983.
- Comstock G.W., Menkes M.S., Schober S.E., Vuillemer J.P., Helsing K.J. Serum levels of retinol, beta-carotene, and alpha-tocopherol in older adults. *Am. J. Epidemiol.* **127**:114-123, 1988.
- Cooper D.A., Olson J.A. Properties of liver retinyl ester hydrolase in young pigs. *Biochim. Biophys. Acta* **884**: 251-258, 1986.
- Cooper D.A., Furr H.C., Olson J.A. Factors influencing the level and interanimal variability of retinyl ester hydrolase activity in rat liver. *J. Nutr.* **117**:2066-2071, 1987.
- Cooper D.A. Assay of liver retinyl ester hydrolase. *Methods Enzymol.* **189**:490-494, 1990.
- Costanzo F., Castagnoli L., Dente L., Arcari P., Smith M., Costanzo P., Raugei G., Izzo P., Pietropaolo T.C., Bougueleret L., Cimino F., Salvatore F., Cortese R. Cloning of several cDNA segments coding for human liver proteins. *EMBO J.* **2**:57-61, 1983.
- Creek K.E., Silverman-Jones C.S., De Luca L.M. Comparison of the uptake and metabolism of retinol delivered to primary mouse keratinocytes either free or bound to rat serum retinol-binding protein. *J. Invest. Dermatol.* **92**:283-289, 1989.
- Crow J.A., Ond D.E. Cell-specific immunohistochemical localization of a cellular retinol-binding protein (type two) in the small intestine of the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**:4707-4711, 1985.
- Cullum M.E., Zile M.H. Metabolism of all-*trans*-retinoic acid and all-*trans*-retinyl acetate: Demonstration of common physiological metabolites in rat small intestinal mucosa and circulation. *J. Biol. Chem.* **260**:10590-10596, 1985.

- Dawson M.I., Hobbs P.D. The synthetic chemistry of retinoids. In: The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine. 2nd ed., M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman eds., Raven Press, New York, NY, 1994.
- de Bruijn D.R.H., Oerlemans F., Hendriks W., Baats E., Ploemacher R. Normal development, growth and reproduction in cellular retinoic acid-binding protein-I (CRABP-I) null mutant mice. *Differentiation* **58**:141-148, 1994.
- de Groot L.C.P.G.M., Hautvast J.G.A.J., van Staveren W.A. Nutrition and health of elderly people in Europe: the EURONUT-SENECA study. *Nutrition Rev.* **50**:185-194, 1992.
- de Thé H., Vivanco-Ruiz M.D.M., Tiollais P., Stunnenberg H., Dejean A. Identification of a retinoic acid-responsive element in the retinoic acid receptor β gene. *Nature* **343**: 177-180, 1990.
- Dew SE, Ong DE. Specificity of the retinol transporter of the rat small intestine brush border. *Biochemistry* **33**: 12340-12345, 1994.
- Dice J.F. Cellular and molecular mechanisms of aging. *Physiol. Rev.* **73**:149-159, 1994.
- Dimitrov N.V., Meyer C.J., Perloff M., Ruppenthal M.M., Pillipitch M.J., Gilliland D., Malone W., Minn F.L. Alteration of retinol-binding protein concentrations by the synthetic retinoid Fenretinide in healthy human subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **51**:1082-1087, 1990.
- Dixon J.L., Goodman D.S. Effect of nutritional and hormonal factors on the metabolism of retinol-binding protein by primary cultures of rat hepatocytes. *J. Cell Physiol.* **130**:6-13, 1987a.
- Dixon J.L., Goodman D.S. Studies on the metabolism of retinol-binding protein by primary hepatocytes from retinol-deficient rats. *J. Cell Physiol.* **130**:14-20, 1987b.
- Dockham P.A., Lee M-O., Sladek N.E. Identification of human liver aldehyde dehydrogenases that catalyse the oxidation of aldophosphamide and retinaldehyde. *Biochem. Pharmacol.* **43**:2453-2469, 1992.
- Dorner H., Fisher B., Seefried G., Platt D., Popa-Wagner A. Fibronectin mRNA (FN-V95⁺) is increased in the liver of old Sprague-Dawley rats: effect of food restriction. *J. Gerontol.* **50A**:B218-B223, 1995.

- Duester G., Shean M.L., McBride M.S., Stewart M.J. Retinoic acid response element in the human alcohol dehydrogenase gene *ADH3*: Implications for regulation of retinoic acid synthesis. *Mol. Cell. Biol.* **11**:1638-1646, 1991.
- Duffy P.H., Feuers R.J., Pipkin J.L., Berg T.F., Leakey J.E.A., Turturro A., Hart R.W. The effect of dietary restriction and aging on the physiological response of rodents to drugs. In: Dietary restriction: Implication for the designs and interpretation of toxicity and carcinogenesis studies. R.W. Hart, D.A. Newman, R.T. Robertson eds., ISLI Press, Washington, D.C., 1995.
- Durand B., Saunders M., Leroy P., Leid M., Chambon P. All-trans and 9-cis-retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. *Cell* **71**: 73-85, 1992.
- Eckhoff C., Collins M.D., Nau H. Human plasma all-*trans*-, 13-*cis*- and 13-*cis*-4-oxoretinoic acid profiles during subchronic vitamin A supplementation: Comparison to retinol and retinyl ester plasma levels. *J. Nutr.* **121**:1016-1025, 1991.
- El Akawi Z., Napoli J.L. Rat liver cytosolic retinal dehydrogenase: comparison of 13-*cis*-, 9-*cis*-, and all-*trans*-retinal as substrates and effects of cellular retinol-binding proteins and retinoic acid on activity. *Biochemistry* **33**:1938-1943, 1994.
- Elder J.T., Åstrom A., Pettersson U., Tavakkol A., Griffiths C.E.M., Krust A., Kastner P., Chambon P., Voorhees J.J. Differential regulation of retinoic acid receptors and binding proteins in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **98**:673-679, 1992.
- Enzan H., Saibara T., Ueda H., Onishi S., Yamamoto Y., Okada T., Hara H. Ultrastructural observation of Ito cells in the aged rats. In: Cells of the Hepatic Sinusoid vol.3, Wisse E., Knook D.L., McCuskey R.S. eds., The Kupffer Cell Foundation, Leiden, The Netherlands, 1991.
- Eriksson U., Hansson E., Nilsson M., Jonsson, K-H., Sundelin J., Peterson P.A. Increased levels of several retinol-binding proteins resulting from retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Cancer Res.* **46**:717-722, 1986.
- Failla G. The aging process and somatic mutations. In: The biology of aging. B. L. Strehler ed., American Institute of Biological Sciences, Washington, D.C., 1960.
- Fawcett D., Pasceri P., Fraser R., Colbert M., Rossant J., Giguere V. Postaxial polydactyly in forelimbs of CRABP-II mutant mice. *Development* **121**:671-679, 1995.
- Ferland G., Tuchweber B., Perea A., Yousef I.M. Effect of aging and dietary restriction on bile acid metabolism. *Lipids* **24**:842-848, 1989.

- Ferland G., Audet M., Tuchweber B. Effect of dietary restriction on lysosomal bodies and total protein synthesis in hepatocytes of aging rats. *Mech. Ageing Dev.* **64**:49-59, 1992a.
- Ferland G., Tuchweber B., Bhat P.V., Lacroix A. Effect of dietary restriction on hepatic vitamin A content in aging rats. *J. Gerontol.* **47**:B3-B8, 1992b.
- Fernandes G. Modulation of immune functions and aging by omega-3 fatty acids and/or calorie restriction. In: The potential for nutritional modulation of aging processes. D.K. Ingram, G.T. Baker III, N.W. Shock eds., Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, Connecticut, USA, 1991.
- Fex G., Johannesson G. Studies of the spontaneous transfer of retinol from the retinol-binding protein complex to unilamellar liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **901**:255-264, 1987.
- Fex G., Johannesson G. Retinol transfer across and between phospholipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **944**:249-255, 1988.
- Finlay J.A., Strom M., Ong D.E., DeLuca H.F. Regulation of cellular retinol-binding protein type II by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochemistry* **29**:4914-4921, 1990.
- Fiorella P.D., Napoli J.L. Microsomal retinoic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* **268**:21545-21552, 1994.
- Fisher G.J., Reddy A.P., Datta S.C., Kang S., Yi J.Y., Chambon P., Voorhees J.J. All-trans-retinoic acid induces cellular retinol-binding protein in human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* **105**:80-86, 1995.
- Fleming B.B., Barrows C.H. Influence of aging on absorption of vitamins A and D by the rat. *Exp. Gerontol.* **17**:115-120, 1982.
- Friedman S.L., Wei S., Blaner W.S. Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: Regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF. *Am. J. Physiol.* **264**:G947-G952, 1993.
- Frolik C.A. Metabolism of retinoids. In: The Retinoids, vol. 2, M.B. Sporn, A.B. Roberts and D.S. Goodman eds., Academic Press, Orlando, FL, pp. 177-208, 1984.
- Gad M.Z., Harrison E.H. Neutral and acid retinyl ester hydrolases associated with rat liver microsomes: Relationships to microsomal cholesteryl ester hydrolases. *J. Lipid Res.* **32**:685-693, 1991.

- Garcea R., Daino L., Frassetto S., Cozzolino P., Ruggiu M., Yannini M.G., Pascale R., Lenzerini L., Simile M.M., Puddu M., Feo F. Reversal by ribo- and deoxyribonucleosides of dehydroepiandrosterone-induced inhibition of enzyme altered foci in the liver of rats subjected to the initiation-selection process of experimental carcinogenesis. *Carcinogenesis* **9**:931-938, 1988.
- Garrow J.S. Energy balance and obesity in man. Elsevier/North Holland, Amsterdam, The Netherlands 1974.
- Garry P.J., Hunt W.C., Bandrofchak J.L., Vanderjagt D., Goodwin J.S. Vitamin A intake and plasma retinol in healthy men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **46**:989-994, 1989.
- Gerlach T.H., Zile M.H. Effect of retinoic acid and apo-RBP on serum retinol concentration in acute renal failure. *FASEB J.* **5**:86-92, 1991.
- Gibson, R.S. Principles of Nutritional Assessment, Gibson RS ed., Oxford University Press, New York, 1990.
- Giguère V., Ong E.S, Segui P., Evans R.M. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* **330**:624-629, 1987.
- Gjoen T., Bjerkelund T., Blomhoff H.K., Norum K.R., Berg T., Blomhoff R. Liver takes up retinol-binding protein from plasma. *J. Biol. Chem.* **262**:10926-10930, 1987.
- Glover J., Jay C., White G.H. Distribution of retinol-binding protein in tissues. *Vitam. Horm.* **32**:215-235, 1974.
- Goodman D.S., Huang H.S., Shiratori T. Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin A in the rat. *J. Lipid Res.* **6**:390-396, 1965.
- Goodman D.S., Blomstrand R., Werner B., Huang H.S., Shiratori T. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and β -carotene in man. *J. Clin. Invest.* **45**:1615-1623, 1966.
- Goodman D.S. Plasma retinol-binding protein. In: The retinoids vol. 2, M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman eds., Academic Press, Orlando, FL, 1984.
- Grasl-Kraupp B., Bursch W., Ruttkey-Nedecky B., Wagner A., Lauer B., Sculte-Hermann R. Food restriction eliminates preneoplastic cells through apoptosis and antagonizes carcinogenesis in rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**:9995-9999, 1994.

- Green M.H., Uhl L., Green J.B. A multicompartamental model of vitamin A kinetics in rats with marginal liver vitamin A stores. *J. Lipid Res.* **26**:806-818, 1985.
- Green M.H., Green J.B. Multicompartamental analysis of whole body retinol dynamics in vitamin A-sufficient rats. *Fed. Proc.* **46**:1011, 1987.
- Gross L., Dreyfuss Y. Prevention of spontaneous and radiation induced tumors in rats by reduction of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**:6795-6797, 1990.
- Guerrant H.B. Influence of age and of vitamin A intake on the storage of vitamin A in the liver of the rat. *J. Nutr.* **37**:37-51, 1949.
- Han E., Levin N., Bergani B., Roberts J., Suh Y., Karelus K., Nelson J. Hyperadrenocorticism and food restriction-indices extension in the rat: evidence for divergent regulation of pituitary proopiomelanocortin-RNA and adrenocorticotrophic hormone synthesis. *J. Gerontol.* **50A**:B288-B294, 1995.
- Haq R.U., Chytil F. Retinoic acid rapidly induces lung cellular retinol-binding protein mRNA levels in retinol-deficient rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **156**:712-716, 1988.
- Harman D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**:7124-7128, 1981.
- Harnish D.C., Soprano K.J., Soprano D.R. Mouse conceptuses have a limited capacity to elevate the mRNA level of cellular retinoid binding proteins in response to teratogenic doses of retinoic acid. *Teratology* **46**:137-146, 1992.
- Harrisson D.E., Archer J.R., Astole C.M. Effects of food restriction on aging : separation of food intakes and adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**:1835-1838, 1984.
- Harrison E.H., Gad M.Z. Hydrolysis of retinyl palmitate by enzymes of rat pancreas and liver. *J. Biol. Chem.* **264**:17142-17147, 1989.
- Harrison, E.H. Enzymes catalysing the hydrolysis of retinyl esters. *Biochim. Biophys. Acta* **1170**:99-108, 1993.
- Hendriks H.F.J., Verhoofstad W.A.M.M., Brouwer A., de Leeuw A.M., Knook D.L. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in the rat liver. *Exp. Cell Res.* **160**:138-149, 1985.

- Hendriks H.F.J., Blaner W.S., Wennekers H.M., Piantedosi R., Brouwer A., de Leeuw A.M., Goodman D.S., Knook D.L. Distributions of retinoids, retinoid-binding proteins and related parameters in different types of liver cells isolated from young and old rats. *Eur. J. Biochem.* :237-244, 1988.
- Herr F.M., McDonald P.M., Ong D.E. Solubilization and partial characterization of lecithin-retinol acyltransferase from rat liver. *J. Nutr. Biochem.* 2:503-511, 1991.
- Herr F.M., Ong D.E. Differential interaction of lecithin:retinol acyltransferase with cellular retinol binding proteins. *Biochemistry* 31:6748-6755, 1992.
- Heydari A.R., Wu B., Takahashi R., Richardson A.G. The expression of heat shock protein 70 is altered by age and diet at the level of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 13:2909-2919, 1993.
- Heydari A.R., Conrad C.C., Richardson A. Expression of heat shock genes in hepatocytes is affected by age and food restriction in rats. *J. Nutr.* 125:410-418, 1995.
- Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Kyck J.A., Stein R.B., Eichele G., Evans R.E., Thaller C. 9-cis-retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 66:397-406, 1992.
- Hicks R.J. Night blindness in the Confederate army. *Richmond Med. J.* 3:34-38, 1867.
- Higami Y., Yu B.P., Schimokawa I., Masoro E.J., Ikeda T. Duration of dietary restriction: an important determinant for the incidence and age of onset of leukemia in male F344 rats. *J. Gerontol.* 49:B239-B244, 1994.
- Higami Y., Yu B.P., Schimokawa I., Bertrand H., Hubbard G.V.B., Masoro E.J. Antitumor action of dietary restriction is lesion-dependent in male Fisher 344 rats. *J. Gerontol.* 50A:B72-B77, 1995.
- Hodam J.R., St. Hilaire P., Creek K.E. Comparison of the rate of uptake and biological effects of retinol added to human keratinocytes either directly to the culture medium or bound to serum retinol-binding protein. *J. Invest. Dermatol.* 97:298-304, 1991.
- Hollander D., Morgan D. Aging: its influence on vitamin A intestinal absorption in vivo by the rat. *Exp. Gerontol.* 14:201-204, 1979.
- Hollander, D. Intestinal absorption of vitamins A, E, D, and K. *J. Lab. Clin. Med.* 97:449-462, 1981.

- Hollander D., Dadufalza V., Weindruch R., Walford R.L. Influence of life-prolonging dietary restriction on intestinal vitamin A absorption in mice. *Age* 9:57-60, 1986.
- Hollander D., Dadufalza V. Influence of aging on vitamin A transport into the lymphatic circulation. *Exp. Gerontol.* **25**:61-65, 1990.
- Holliday R. The ancient origins and causes of ageing. *News Physiol. Sci.* **7**:38-40, 1992.
- Hollows J.O., Smith E.K. Longevity of cold-exposed rats: a reevaluation of the «rate of living theory». *J. Appl. Physiol.* **61**:1656-1660, 1986.
- Hussain M.M., Mahley R.W., Boyles J.K., Lindquist P.A., Brecht W.J., Innerarity T. Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animals species. *J. Biol. Chem.* **264**:17931-17938, 1989.
- Hussman M., Hoffman B., Stump D.G., Chytil F., Pfahl M. A retinoic acid response element from the rat CRBPI promoter is activated by an RAR/RXR heterodimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**:1558-1564, 1992.
- Imamine T., Okunu M., Moriwaki H., Shidiji Y., Muto Y., Seishima M., Noma A., Kojima S. Impaired synthesis of retinol-binding protein and transthyretin in rat liver with bile duct obstruction. *Digest. Diseases Sci.* **41**:1038-1042, 1996.
- Ingenbleek Y., Young V. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annu. Rev. Nutr.* **14**:495-533, 1994.
- Ishigami A., Goto S. Effect of dietary restriction on the degradation of proteins in senescent mouse parenchymal cells in culture. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**:362-366, 1990.
- Iwai H., Fernandes G. Immunological functions in food-restricted rats: Enhanced expression of high-affinity interleukin-2 receptors on splenic T-cells. *Immunol. Lett.* **23**:125-132, 1989.
- Iwasaki K., Gleiser C.A., Masoro E.J., McMahan C.A., Seo E.J., Yu B.P. The influence of dietary protein source on longevity and age-related disease processes of Fisher rats. *J. Gerontol.* **43**:B5-B12, 1988a.
- Iwasaki K., Gleiser C.A., Masoro E.J., McMahan C.A., Seo E.J., Yu B.P. Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fisher rats: the fat component and the mineral component. *J. Gerontol.* **43**:B13-B21, 1988b.

- James S.J., Muskhelishvili L. Rates of apoptosis and proliferation vary with caloric intake and may influence incidence of spontaneous hepatoma in C57BL/6 × C3HF1 mice. *Cancer Res.* **54**:5508-5510, 1994.
- Kaiser-Kupfer M.I., Peck G.I., Caruso R.C., Jaffe M.J., DiGiovanna J.J., Gross E.G. Abnormal retinal function associated with Fenretinide, a synthetic retinoid. *Arch. Ophthalmol.* **10**:69-70, 1986.
- Kakkad B.P., Ong D.E. Reduction of retinaldehyde bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J. Biol. Chem.* **263**:12926-12919, 1988.
- Kanai M., Raz A., Goodman D.S. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J. Clin. Invest.* **47**:2025-2044, 1968.
- Kanungo M.S. A model for ageing. *J. Theor. Biol.* **53**:252-261, 1975.
- Kato M., Kato K., Goodman D.S. Immunocytochemical studies on the localization of plasma and cellular retinol-binding proteins and of transthyretin (prealbumin) in rat liver and kidney. *J. Cell. Biol.* **98**:1696-1704, 1984.
- Kato M., Blaner W.S., Mertz J.R., Das K., Kato K., Goodman D.S. Influence of retinoid nutritional status on cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding protein concentrations in various rat tissues. *J. Biol. Chem.* **260**:4832-4838, 1985.
- Kimball S.R., Chen S-J., Risica R., Jefferson L.S., Leure-duPree A.E. Effects of zinc deficiency on protein synthesis and expression of specific mRNA_s in rat liver. *Metabolism* **44**:126-133, 1995.
- Kivelä S.L., Mäenpää P., Nissinen A. Et al. Vitamin A, Vitamin E and selenium status in an aged Finnish male population. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **59**:373-380, 1989.
- Klebanov S., Shehab D., Stavinoha W.B., Yongman S., Nelson J.F. Hyperadrenocorticism attenuated inflammation, and the life prolonging action of food restriction in mice. *J. Gerontol.* **50A**:B78-B82, 1995.
- Kliewer S.A., Umesono K., Heyman R.A., Mangelsdorf D.J., Dyck J.A., Evans R.M. Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoid acid signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1448-1452, 1992a.
- Kliewer S.A., Umesono K., Noonan D.J., Heyman R.A., Evans R.M. Convergence of 9cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* **358**: 771-774, 1992b.

- Koizumi A., Weindruch R., Walford R.L., Influence of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice. *J. Nutr.* **117**:361-367, 1987.
- Kowland A., Kirkwood T.B.L. Towards a network theory of ageing: a model combining free radical theory and protein error theory. *J. Theor. Biol.* **168**:75-94, 1994.
- Krasinski S.D., Russell R.M., Pradovec C.L., Sadowski J.A., Hartz S.C., Jacob R.A., McGandy R.B. Relationship of vitamin A and vitamin E intake to fasting plasma retinol, retinol-binding protein, retinyl esters, carotene, α -tocopherol, and cholesterol among elderly people and young adults: increased plasma retinyl esters among vitamin A-supplement users. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**:112-120, 1989.
- Krasinski S.D., Cohn J.S., Schaefer E.J., Russell R.M. Postprandial plasma retinyl ester response is greater in older subjects compared with younger subjects. *J. Clin. Invest.* **85**:883-892, 1990.
- Kritchevsky D., Welch C.B., Klurfeld M.D. Response of mammary tumors to caloric restriction for different time periods during the promotion phase. *Nutr. Cancer* **12**:259-269, 1989.
- Kurlandsky S.B., Gamble M.V., Ramakrishnan R., Blaner W.S. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J. Biol. Chem.* **270**:17850-17857, 1995.
- Labrecque J., Dumas F., Lacroix A., Bhat P.V. A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis-and all-trans retinoic acid. *Biochem. J.* **305**:681-684, 1995.
- Laganier S., Yu B.P. Anti-lipoperoxidation action of food restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**:1185-1191, 1987.
- Laganier S., Yu B.P. Effect of chronic food restriction in aging rats. I. Liver subcellular membranes. *Mech. Ageing Dev.* **48**:207-219, 1989a.
- Laganier S., Yu B.P. Effect of chronic food restriction in aging rats. II. Liver cytosolic antioxidant and related enzymes. *Mech. Age. Dev.* **48**:221-230, 1989b.
- Laganier S., Yu B.P. Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction. *Gerontology* **39**:7-18, 1993.
- Lampron C., Rochette-Egly C., Gorry P., Dollé P., Mark M., Lufkin T., LeMeur M., Chambon P. Mice deficient in cellular retinoic acid-binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABP II are essentially normal. *Development* **121**:539-548, 1995.

- Laurent B.C., Nilsson M.H.L., Båvik C.O., Jones T.A., Sundelin J., Peterson P.A. Characterization of the rat retinol-binding protein gene and its comparison to the three-dimensional structure of the protein. *J. Biol. Chem.* **260**:11476-11480, 1985.
- Lee M-O., Manthey C.L., Sladek N.E. Identification of mouse liver aldehyde dehydrogenases that catalyse the oxidation of retinaldehyde to retinoic acid. *Biochem. Pharmacol.* **42**:1279-1285, 1991.
- Lehman E.D., Spivey H.O., Thayer R.H., Nelson E.C. The binding of retinoic acid to serum albumin in plasma. *Fed. Proc. (Fed. Am. Soc. Exp. Biol.)* **31**:A672, 1972.
- Lehmann J.M., Zhang X.-K., Pfahl M. RARgamma2 expression is regulated through a retinoic acid response element embedded in Sp1 sites. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2976-2985, 1992.
- LeMoullac B., Gouache P., Bleiberg-Daniel F. Regulation of hepatic transthyretin messenger RNA levels during moderate protein and food restriction. *J. Nutr.* **122**:864-870, 1992.
- Leo M.A., Lasker J.M., Raucy J.L., Kim C-I., Black M., Lieber C.S. Metabolism of retinol and retinoic acid by liver cytochrome P450IIC8. *Arch. Biochem. Biophys.* **269**:305-312, 1989.
- Leroy P., Nakshatri H., Chambon P. Mouse retinoic acid receptor $\alpha 2$ isoform is transcribed from a promotor that contains a retinoic acid response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10138-10142, 1991.
- Lespine A., Periquet B., Jaconi S., Alexandre M-C., Garcia J., Ghisolfi J., Thouvenot J-P., Siegenthaler G. Decreases in retinol and retinol-binding protein during total parenteral nutrition in rats are not due to a vitamin A deficiency. *J. Lipid Res.* **37**:2492-2501, 1996.
- Levin A.A., Sturzenbecker L.J., Kazmer S., Bosakowski T., Huselton C., Allenby G., Speck J., Kratzeisen C.L., Rosenberger M., Lovey A., Grippo J.F. 9-Cis-retinoic acid stereoisomer binds and activate the nuclear receptor RXR α . *Nature* **355**:359-361, 1992.
- Levin G., Cogan U., Mokady S. Food restriction and membrane fluidity. *Mech. Ageing Dev.* **62**:137-141, 1992.
- Levin M.S. Cellular retinoil-binding proteins are determinants of retinol uptake and metabolism in stably transfected Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* **268**:8267-8276, 1993.

- Lewis K.C., Green M.H., Green J.B., Zech L.A. Retinol metabolism in rats with low vitamin A status: a compartmental model. *J. Lipid Res.* **31**:1535-1548, 1990.
- Linley L.K., Reynolds K., Lentner M., ????? S.J. Maintenance requirements for dietary protein in 11-and 18-month-old male rats. *J. Gerontol.* **50A**:B54-B57, 1995.
- Lippel K., Olson J.A. Biosynthesis of β -glucuronides of retinol and retinoic acid in vivo and in vitro. *J. Lipid Res.* **9**:168-175, 1968.
- Lisssoos T.W., Davis A.E., Levin M.S. Vitamin A trafficking in Caco-2 cells stably transfected with cellular retinol-binding proteins. *Am. J. Physiol.* **268**:G224-G231, 1995.
- Lloyd T., Boyd B. Development and regulation of hypertension in the spontaneously hypertensive rat: enzymatic and nutritional studies. In: Function and regulation of monoamine enzymes: basic and clinical aspects. E. Usdin, N. Weiner, M.B.H. Youdin eds., Macmillan Press, London, 1981.
- Lloyd T. Food restriction increases life span of hypertensive animals. *Life Sci.* **34**:410-417, 1984.
- Lucas P.C., Forman B.M., Samuels H.H., Granner D.K. Specificity of a retinoic acid response element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter: Consequences of both retinoic acid and thyroid hormone receptor binding. *Mol. Cell. Biol.* **11**:5164-5170, 1991.
- Madsen K.M., Tisher C.C. Physiologic anatomy of the kidney. In: Kidney hormones, vol. 3, J.W. Fisher ed., Academic Press, London, 1986.
- Maeda H. et al. Nutritional influences on aging of Fisher 344 rats: II. Pathology. *J. Gerontol.* **40**:671-688, 1985.
- Mahadevan S., Ayyoub N.I., Roels O.A. Hydrolysis of retinyl palmitate by rat liver. *J. Biol. Chem.* **241**:57-64, 1966.
- Makover A., Soprano D.R., Wyatt M.L., Goodman D.S. Localization of retinol-binding protein messenger RNA in the rat kidney and in perinephric fat tissue. *J. Lipid Res.* **30**:171-180, 1989.
- Mangelsdorf D.J., Ong E.S., Dyck J.A., Evans R.M. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid-response pathway. *Nature* **335**:733-735, 1990.

- Mangelsdorf D.J., Umesono K., Kliewer S.A., Borgmeyer U., Ong E.S., Evans R.M. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* **66**:555-561, 1991.
- Mangelsdorf D.J., Borgmeyer U., Heyman R.A., Zhou J.Y., Ong E.S., Oro A.E., Kakizuka A., Evans R.M. Characterization of the three RXR genes that mediate the action of 9-*cis*-retinoic acid. *Gene Dev.* **6**:329-344, 1992.
- Mangelsdorf D.J. Vitamin A receptors. *Nutr. Rev.* **52**:S32-S44, 1994.
- Mangelsdorf D.J., Umesono K., Evans R.M. The retinoid receptors. In: *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine*. 2nd ed., M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman eds., Raven Press, New York, NY, 1994.
- Masoro E.J., Yu B.P., Bertrand H.A. Action of food restriction in delaying the aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**:4239-4241, 1982.
- Masoro E.J. Metabolism. In: *Handbook of the biology of aging*, 2nd ed., C. Finch and E.L. Schneider eds., Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 1985.
- Masoro E.J. Food restriction in rodents: an evaluation of its role in the study of aging. *J. Gerontol.* **43**:B59-B64, 1988.
- Masoro E.J., Iwasaki K., Gleiser C.A., McMahan C.A., Seo E.J., Yu B.P. Dietary modulation of the progression of nephropathy in aging rats. *Am. J. Clin. Nutr.* **49**:1217-1227, 1989.
- Masoro E.J. Caloric restriction and aging in rats. In: *The potential for nutritional modulation of aging processes*. D.K. Ingram. G.T. Baker III, N.W. Shock eds., Food & Nutrition Press Inc., Trumbull, Connecticut, USA, 1991.
- Masoro E.J. Diet and the aging processes. *Clin. J. Sport Med.* **4**:262-267, 1994.
- Masoro E.J., Shimikawa I., Higami Y., McMahan C.A., Yu B.P. Temporal pattern of food intake not a factor in the retardation of aging processes by dietary restriction. *J. Gerontol.* **50A**:B48-B53, 1995.
- Masoro E.J. Possible mechanisms underlying the antiaging actions of caloric restriction. *Toxicol. Pathol.* **24**:738-741, 1996.
- Masoro E.J., Austad S.N. The evolution of the antiaging action of dietary restriction: a hypothesis. *J. Gerontol.* **51A**:B387-B391, 1996.

- Matsuura T., Ross C.A. Regulation of hepatic lecithin: retinol acyltransferase activity by retinoic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**:221-227, 1993.
- Matsuura T., Gad M.Z., Harrison E.H., Ross C.A. Lecithin: retinol acyltransferase and retinyl ester hydrolase are differentially regulated and have distinct distributions between hepatocyte and nonparenchymal cell fractions of rat liver. *J. Nutr.* **127**:218-224, 1997.
- McCarter R.J.M., Palmer J. Energy metabolism and aging: A life-long study of Fisher 344 rats. *Am. J. Physiol.* **263**:E448-E452, 1992.
- McCay C., Crowell M., Maynard L. The effect of retarded growth upon the length of life and upon the ultimate size. *J. Nutr.* **10**:63-79, 1935.
- Medvedev Z.A. The nucleic acids in development and aging. In: Advances in gerontological research. vol 1, B.L. Strehler ed., Academic Press, New York, NY, 1964.
- Medvedev Z. An attempt at rational classification of theories of ageing. *Biol Rev.* **65**:375-398, 1990.
- Mehta R., Barua A.B., Moon R.C., Olson J.A. Interactions between retinoid β -glucuronides and cellular retinol- and retinoid acid-binding proteins. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **62**:143-147, 1992.
- Melhus H., Nilsson T., Peterson P.A., Rask L. Retinol-binding protein and transthyretin expressed in HeLa cells form a complex in the endoplasmic reticulum in both the absence and presence of retinol. *Exp. Cell Res.* **197**:119-124, 1991.
- Melhus H., Laurent B., Rask L., Peterson P.A. Ligand-dependent secretion of rat retinol-binding protein expressed in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **267**:12036-12041, 1992.
- Mercier M., Forget A., Grolier P., Azais-Braesco V. Hydrolysis of retinyl esters in rat liver. Description of a lysosomal activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**:176-182, 1994.
- Merry B.J., Holehan A.M. Effects of diet on aging. In: Physiological basis of aging and geriatrics, 2nd ed., P.S. Timiras ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.
- Moore T. Vitamin A. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1957.

- Moriwaki H., Blaner W.S., Piantedosi R., Goodman D.S. Effects of dietary retinoids and triglyceride on the lipid composition of rat liver stellate cells and stellate cells lipid droplets. *J. Lipid Res.* **29**:1523-1534, 1988.
- Morrisson A., Christina-Moroni M., Ariza-McNaughton L., Krumlauf R., Mavilio F. In vitro and transgenic analysis of human *Hoxd-4* retinoid responsive enhancer. Development (in press).
- Mote P.L., Grizzle J.M., Walford R.L. Spindler S.R. Influence of age and caloric restriction on expression of hepatic genes for xenobiotic and oxygen metabolizing enzymes in the mouse. *J. Gerontol.* **46**:B95-B100, 1991.
- Mourey M.-S., Amédée-Manesme O. Retinyl palmitate hydrolase activity in human liver. *Am. J. Clin. Nutr.* **55**:729-733, 1992.
- Mourey M-S., Quadro L., Panariello L., Coluantuoni V. Retinoids regulate expression of the retinol-binding protein gene in hepatoma cells in culture. *J. Cell. Physiol.* **160**:596-602, 1994.
- Munck A., Guyre P.M., Holbrook N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Rev.* **5**:25-44, 1984.
- Nagata T., Segars J.H., Levi B.-Z., Ozato K. Retinoic acid-dependent transactivation of major histocompatibility complex class I promoters by the nuclear hormone receptor H-2RIIRB in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 937-941, 1992.
- Nakshatri H., Chambon P. The directly repeated RG(G/T)TCA motifs of the rat and mouse cellular retinol-binding protein II genes are promiscuous binding sites for RAR, RXR, HNF-4, and ARP-1 homo- and heterodimers. *J. Biol. Chem.* **269**:8980-902, 1994.
- Napoli J.L., Pacia E.B., Salerno G.J. Cholate effects on all-trans-retinyl palmitate hydrolysis in tissue homogenates: Solubilization of multiple kidney membrane hydrolases. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**:192-199, 1989.
- Napoli J.L., Boerman M.H.E.M., Chai X., Zhai Y., Fiorella P.D. Enzymes and binding proteins affecting retinoic acid concentrations. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **53**:497-502, 1995.
- Napoli J.L. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* **10**:993-1001, 1996a.

- Napoli J.L. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **80**:S52-S62, 1966.
- Navarro J.M., Casatorres J., Jorcano J.L. Elements controlling the expression and induction of the skin hyperproliferation-associated keratin K6. *J. Biol. Chem.* **270**:21362-21367, 1995.
- National Research Council, National Academy of Sciences. Requirements of the laboratory rat. In: Nutrient requirements of laboratory animals, fourth revised edition. National Academy Press, Washington, D.C., 1995.
- Newcomer M.E., Liljas A., Sundelin J., Rask L., Peterson P.A. Crystallization of and preliminary X-ray data for the plasma retinol-binding protein. *J. Biol. Chem.* **259**:5230-5231, 1984.
- Noy N., Xu Z-J. Interactions of retinol with binding proteins: implications for the mechanism of uptake by cells. *Biochemistry* **29**:3878-3883, 1990a.
- Noy N., Xu Z-J. The thermodynamic parameters of the binding of retinol to binding proteins and to membranes. *Biochemistry* **29**:3888-3892, 1990b.
- Noy N., Blaner W.S. Interactions of retinol with binding proteins: Studies with rat cellular retinol-binding protein and with rat retinol-binding protein. *Biochemistry* **30**:6380-6386, 1991.
- Noy N., Slosberg E., Scarlata S. Interaction of retinol with binding proteins: studies with retinol-binding protein and with transthyretin. *Biochemistry* **31**:1118-1124, 1992.
- Olson, J.A. Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin A in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **45**:704-716, 1987.
- Olson J.A. Provitamin A function of carotenoids: The conversion of β -carotene into vitamin A. *J. Nutr.* **119**:105-108, 1989.
- Olson J.A. Vitamin A. In: Present Knowledge in Nutrition, 6th edition, M.L. Brown ed., International Life Sciences Institute, Washington, D.C., 1990.
- Olson J.A., Moon R.C., Anders M.W., Fenselau C., Shane B. Enhancement of biological activity by conjugation reactions. *J. Nutr.* **122**: 615-623, 1992.
- Ong, D.E. Retinoid metabolism during intestinal absorption. *J. Nutr.* **123**:351-355, 1993.

- Ong D.E. Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr. Rev.* **52**:S24-S31, 1994.
- Ong D.E., Newcomer M.E., Chytil F. Cellular retinoid-binding proteins. In: *The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine*. 2nd ed., M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman eds., Raven Press, New York, NY, 1994.
- Ordy J.M., Samorajski T., Zeman W., Curtis H.J. Interaction effects of environmental stress and deuterium irradiation of the brain on mortality and longevity of C57BL/10 mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **126**:184-190, 1967.
- Orgel L.A. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **49**:517-521, 1963.
- Ottonello S., Maraini G., Mammi M., Monaco H.L., Spadon P., Zanotti G. Crystallization and preliminary X-ray data of human retinol-binding protein. *J. Mol. Biol.* **163**:679-681, 1983.
- Ottonello S., Scita G., Mantovani G., Cavazzini D., Rossi G.L. Retinol bound to cellular retinol-binding protein is a substrate for cytosolic retinoic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **268**:27133-27142, 1993.
- Panariello L., Quadro L., Trematerra S., Colantuoni V. Identification of a novel retinoic acid response element in the promoter region of the retinol-binding protein gene. *J. Biol. Chem.* **271**:25524-25532, 1996.
- Pashko L.L., Lewbart M.L., Schwartz A.G. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-promoted skin tumor formation in mice by 16 α -fluoro-5-androsten-17-one and its reversal by deoxyribonucleosides. *Carcinogenesis* **12**:2189-2192, 1991.
- Perez-Castro A.V., Tran V.T., Nguyen-Huu M.C. Defective lens fiber differentiation and pancreatic tumorigenesis caused by ectopic expression of the cellular retinoic acid-binding protein I. *Development* **119**:363-372, 1993.
- Petkovitch M., Brand N.J., Krust A., Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* **330**:444-450, 1987.
- Pfeffer B.A., Clarck V.M., Flannery J.G., Bok D. Membrane receptors for retinol-binding protein in cultures human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **27**:1031-1040, 1986.
- Pfhal M., Chytil F. Regulation of metabolism by retinoic acid and its nuclear receptors. *Annu. Rev. Nutr.* **16**:257-283, 1996.

- Pollard M., Luckert P.H., Snyder D. Prevention of prostate cancer and liver tumors in L-W rats by moderate DR. *Cancer Res.* **64**:686-690, 1989.
- Posch K.C., Enright W.E., Napoli J.L. The synthesis of retinoic acid from retinol by cytosol from alcohol dehydrogenase negative deer mice. *Arch. Biochem. Biophys.* **274**:7027-7037, 1989.
- Posch K.C., Napoli J.L. Multiple retinol dehydrogenases in testes cytosol from alcohol dehydrogenase negative or positive deer mice. *Biochem. Pharmacol.* **43**:2296-2298, 1992.
- Raica N.Jr., Scott J., Lowry L., Sauberlich H.E. Vitamin A concentration in human tissues collected from five areas in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 291-296, 1972.
- Raisher B.D., Gulick T., Zhang Z., Strauss A.W., Moore D.D., Kelly D.P. Identification of a novel retinoid-responsive element in the promoter region of the medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* **267**: 20264-20269, 1992.
- Rajan, N., Blaner, W.S., Soprano, D.R., Suhara, A., Goodman, D.S. Cellular retinol-binding protein messenger RNA levels in normal and retinoid-deficient rats. *J. Lipid Res.* **31**:821-829, 1990.
- Rajan N., Kidd G.L., Talmage D.A., Blaner W.S., Suhara A., Goodman D.S. Cellular retinoic acid-binding protein messenger RNA: levels in rat tissue and localization in rat testis. *J. Lipid Res.* **32**:1195-1204, 1991.
- Ramadori, G. The stellate cell (Ito-cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cell) of the liver. *Virchows Archiv. B Cell Pathol.* **61**:147-158, 1991.
- Randolph R.K., Winkler K.E., Ross C.A. Fatty acyl CoA-dependent and independent retinol esterification by rat liver and lactating mammary gland microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**:500-508, 1991.
- Randolph R.K., Ross C.A. Vitamin A status regulates hepatic lecithin:retinol acyltransferase activity in rats. *J. Biol. Chem.* **266**:16453-16457, 1991a.
- Randolph R.K., Ross C.A. Regulation of retinol uptake and esterification in MCF-7 and HepG2 cells by exogenous fatty acids. *J. Lipid Res.* **32**:809-820, 1991b.
- Rao G., Xia E., Nadakavukaren M.J., Richardson A. Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *J. Nutr.* **120**:602-608, 1990.

- Rask L., Anundi H., Peterson P.A. The primary structure of the human retinol-binding protein. *FEBS Lett.* **104**:55-58, 1979.
- Richard S., Zingg H.H. Identification of a retinoic acid response element in the human oxytocin promoter. *J. Biol. Chem.* **266**: 21428-21433, 1991.
- Richardson A., Butler J.A., Rutherford M.S., Semsei I., Gu M-Z., Fernandes G., Chiang W-H. Effect of age and dietary restriction on the expression of α_{2u} -globulin. *J. Biol. Chem.* **262**:12821-12827, 1987.
- Rigtrup K.M., Ong D.E. A retinyl ester hydrolase activity intrinsic to the brush border membrane of rat small intestine. *Biochemistry* **31**:2920-2926, 1992.
- Rigtrup K.M., Kakkad B., Ong D.E. Purification and partial characterization of a retinyl ester hydrolase from the brush border of rat small intestine mucosa: probable identity with brush border phospholipase B. *Biochemistry* **33**:2661-2666, 1994a.
- Rigtrup K.M., McEwen L.R., Said H.M., Ong D.E. Retinyl ester hydrolytic activity associated with human intestinal brush border membranes. *Am J Clin Nutr* **60**:111-116, 1994b.
- Ritter S.J., Green M.H., Adams W.R., Kelley S.K., Shaffer E.M, Smith J.E. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (Fenretinide) and nephrectomy alter normal plasma retinol-binding protein metabolism. *J. Nutr. Biochem.* **6**:689-696, 1995.
- Ritter S.J., Smith J.E. Retinol-binding protein secretion from the liver of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-treated rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1290**:157-164, 1996.
- Roberts D., Gelperin D., Wiley J.W. Evidence for age-associated reduction in acetylcholine release and smooth muscle response in the rat colon. *Am. J. Physiol.* **267**:G515-522, 1994.
- Roberts E.S., Vaz A.D.N., Coon M.J. Role of isosymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol. Pharmacol.* **41**:427-433, 1992.
- Roels O.A., Trout M., Dujacquier R. Carotene balances on boys in Ruanda where vitamin A deficiency is prevalent. *J. Nutr.* **65**: 115-127, 1958.
- Ronne H., Ocklind C., Wiman K., Rask L., Öbrink B., Peterson P.A. Ligand-dependent regulation of intracellular protein transport: effect of vitamin A on the secretion of the retinol-binding protein. *J. Cell Biol.* **96**:907-910, 1983.

- Rosales F.J., Ritter S.J., Zolfaghari R., Smith J.E., Ross A.C. Effects of acute inflammation on plasma retinol, retinol-binding protein, and its mRNA in the liver and kidneys of vitamin A-sufficient rats. *J. Lipid Res.* **37**:962-971, 1996.
- Rose M., Service P.M. Evolution of aging. In: Review of biological research in aging. M. Rothstein ed., Alan R. Liss Inc., New York, NY, 1985.
- Ross, A.C. Cellular metabolism and activation of retinoids: roles of cellular retinoid-binding proteins. *FASEB J.* **7**:317-327, 1993.
- Rottman J.N., Widom R.L., Nadal-Ginard B., Mahdavi V., Karathanasis S.K. A retinoic acid-responsive element in the apolipoprotein AI gene distinguishes between two different retinoic acid response pathways. *Mol. Cell. Biol.* **11**:3814-3820, 1991.
- Rush M.G., Haq R.U., Chytil F., Opposing effects of retinoic acid and dexamethasone on cellular retinol-binding protein ribonucleic acid levels in the rat. *Endocrinology* **129**:705-709, 1991.
- Russell R.M., Suter P.M. Vitamin requirements of elderly people: an update. *Am. J. Clin. Nutr.* **58**:4-14, 1993.
- Saari J.C. Retinoids in photosensitive systems. In: The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medecine. 2nd ed., M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman eds., Raven Press, New York, NY, 1994.
- Saari J.C., Champer R.J., Asson-Batres M., Garwin G.G., Huang J., Crabb J.W., Milam A.H. Characterization and localization of an aldehyde dehydrogenase to amacrine cells of bovine retina. *Vis. Neurosci.* **12**:263-272, 1995.
- Sabatino F., Masoro E.J., McMahan A., Kuhn R.W. Assessment of the role of the glucocorticoid system in aging processes and in the action of food restriction. *J. Gerontol.* **46**:B171-B179, 1991.
- Sacher G.A. Life table modification and life prolongation. In: Handbook of the biology of aging. C.E. Finch, L. Hayflick eds., Van Nostrand Reinhold, New York, NY, 1977.
- Sahyoun N. Nutrient intake by the NSS elderly population. In: Nutrition in the elderly. The Boston nutritional status survey. S. Hartz, I.M. Rosenberg, R.M. Russell eds., Smith-Gordon & Co Ltd., London, 1992.
- Saito M., Itoh R. Nutritional status of vitamin A in a healthy elderly population in Japan. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **61**:105-109, 1991.

- Salbert G., Fanjul A., Piedrafita F.J., Lu X-P., Kim S-J., Tran P., Pfahl M. RAR_α and RXR_α down-regulate the TGFβ1 promoter by antagonizing AP-1 activity. *Mol. Endocrinol.* **7**:1347-1356, 1993.
- Sandblom P., Åquist J., Jones T.A., van Gunsteren W.F., Tapia O. Structural changes in retinol-binding protein induced by retinol removal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**:564, 1986.
- Sani B.P., Barua A.B., Hill D.L., Shih T-W., Olson J.A. Retinoyl-β-glucuronide: Lack of binding to receptor proteins of retinoic acid as related to biological activity. *Biochem. Pharmacol.* **43**:919-922, 1992.
- Scarpace P.J., Yu B.P. Diet restriction retards the age-related loss of beta-adrenergic receptors and adenylate cyclase activity in rat lung. *J. Gerontol.* **42**:442-446, 1987.
- Schaffer E.M., Ritter S.J., Smith J.E. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (Fenretinide) induces retinol-binding protein secretion from liver and accumulation in the kidneys in rats. *J. Nutr.* **123**:1497-1503, 1993.
- Schreiber G., Tsykin A., Aldred A.R., Thomas T., Fung W-P., Dickson P.W., Cole T., Birch H., De Jong F.A., Milland J. The acute phase response in the rodent. *Ann. NY Acad. Sci.* **557**:61-86, 1989.
- Schüle R., Umesono K., Mangelsdorf D.J., Bolado J., Pike J.W., Evans R.M. Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell* **61**: 497-504, 1990.
- Schüle R., Rangarajan P., Kliwer S., Ransone L.J., Bolado J., Verma I.M., Evans R.M. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1 responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:6092-6096, 1991.
- Schwartz A.G., Pashko L.L. Role of adrenocortical steroids in mediating cancer preventive and age-retarding effects of food restriction in laboratory rodents. *J. Gerontol.* **49**:B37-B41, 1994.
- Semsei I., Rao G., Richardson A. Changes in the expression of superoxide dismutase and catalase as a function of age and dietary restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**:620-628, 1989.
- Senoo H., Stang E., Nilsson A., Kindberg G.M., Berg T., Roos N., Norum K.R., Blomhoff R. Internalization of retinol-binding protein in parenchymal and stellate cells of rat liver. *J. Lipid Res.* **33**:1229-1239, 1990.

- Shantz L.M., Talalay P., Gordon G.B. Mechanism of inhibition of growth of 3T3-L1 fibroblasts and their differentiation to adipocytes by dehydroepiandrosterone and related steroids: role of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:3852-3856, 1989.

- Sharma R. Theories of aging. In: Physiological basis of aging and geriatrics, 2nd ed., P.S. Timiras ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.

- Sherman D.R., Lloyd S., Chytil F. Rat cellular retinol-binding protein:cDNA sequence and rapid retinol-dependent accumulation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:3209-3213, 1987.

- Shingleton J.L., Skinner M.K., Ong D.E. Characterization of retinol accumulation from serum retinol-binding protein by cultured Sertoli cells. *Biochemistry* **28**:9641-9647, 1989.

- Sivaparasadarao A., Findley J.C.B. The interaction of retinol-binding protein with its plasma-membrane receptor. *Biochem. J.* **255**:561-570, 1988.

- Smith J.E., Milch P.O., Muto Y., Goodman D.S. The plasma transport and metabolism of retinoic acid in the rat. *Biochem. J.* **132**:821-827, 1973.

- Smith J.E., Brown E.D., Smith J.C. The effect of zinc deficiency on the metabolism of retinol-binding protein in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* **84**:692-697, 1976.

- Sohal R.S., Ku H.H., Agarwal S., Forster M.J., Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defense during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech. Ageing Dev.* **74**:121-133, 1994.

- Solomons N. W., Russell R.M. The interactions of vitamin A and zinc: Implication for human nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**:2031-2040, 1980.

- Soprano D.R., Smith J.E., Goodman D.S. Effect of retinol status on retinol-binding protein biosynthesis in rat and translatable messenger RNA levels in rat liver. *J. Biol. Chem.* **257**:7693-7697, 1982.

- Soprano D.R., Soprano K., Goodman D.S. Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissue of the rat. *J. Lipid Res.* **27**:166-171, 1986.

- Soprano D.R., Blaner W.S. Plasma-retinol binding protein. In: The Retinoids. Biology, Chemistry, and Medicine. 2nd ed., M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman eds., Raven Press, New York, NY, 1994.

- Spindler S.R., Grizzle J.M., Walford R.L., Mote P.L. Aging and restriction of dietary calories increases insulin receptor mRNA, and aging increases glucocorticoid receptor mRNA in the liver of female C3B10RF₁ mice. *J. Gerontol.* **46**:B233-B237, 1991.

- Srivastava V.K., Busbee D.L. Decrease fidelity of DNA polymerases and decreased DNA excision repair in aging mice: effects of caloric restriction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**:712-720, 1992.

- Strehler B.L. Time cells and aging, 2nd ed., Academic Press, New York, NY, 1977.

- Stuchliková E., Jurikova-Horaková M., Deyl Z. New aspects of dietary effect of life prolongation in rodents. What is the role of obesity in aging? *Exp. Gerontol.* **10**:141-145, 1975.

- Succari M., Garric B., Ponteziere C., Miocque M., Cals M.J. Influence of sex and age on vitamin A and E status. *Age and Ageing* **20**:413-416, 1991.

- Suhara H., Kato M., Kanai M. Ultrastructural localization of plasma retinol-binding protein in rat liver. *J. Lipid Res.* **31**:1669-1681, 1990.

- Sundboom J., Olson J.A. Effect of aging on the storage and catabolism of vitamin A in mice. *Exp. Gerontol.* **19**:257-265, 1984.

- Sundelin J., Laurent B.C., Anundi H., Träråch L., Larhammar D., Bjöck L., Eriksson U., Åkerström B., Jones A., Newcomer M., Peterson P.A., Rask L. Amino acid sequence homologies between rabbit, rat, and human retinol-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **260**:6472-6480, 1985.

- Suruga K., Suzuki R., Goda T., Takase S. Unsaturated fatty acids regulate gene expression of cellular retinol-binding protein, type II in rat jejunum. *J. Nutr.* **125**:2039-2044, 1995.

- Sweda L.I. Age-related increase in liver retinyl palmitate: relationship to lipofuscin. *J. Biol. Chem.* **269**:8712-8715, 1994.

- Tang G., Russell R.M. 13-*cis* Retinoic acid is an endogenous compound in human serum. *J. Lipid Res.* **30**:175-182, 1990.

- Tang G., Russell R.M. Formation of all-*trans*-retinoic acid and 13-*cis*-retinoic acid from all-*trans*-retinyl palmitate in humans. *J. Nutr. Biochem.* **2**:210-213, 1991.

- Tannenbaum A. The dependence of tumor formation on the composition of the calorie-restricted diet as well as on the degree of restriction. *Cancer Res.* **5**:616-625, 1945.
- Tannenbaum A., Silverstone H. Effects of limited food intake on survival of mice bearing spontaneous mammary carcinoma and on the incidence of lung metastases. *Cancer Res.* **13**:532-536, 1953.
- Thaller C., Eichele G. Isolation of 3,4-didehydroretinoic acid, a novel morphogenetic signal in the chick wing bud. *Nature* **345**:815-819, 1990.
- Thompson A.B.R. Unstirred water layers: a basic mechanism of gastrointestinal mucosal cell cytoprotection. In: Basic mechanisms of gastrointestinal mucosal cell injury and protection, J.W. Harmon ed., Williams and Wilkins, Baltimore, 1981.
- Tillman J.B., Mote P.L., Dhahbi J.M., Walford R.L., Spindler S.R. Dietary energy restriction in mice negatively regulates hepatic glucose-regulated protein 78 (GRP78) expression at the posttranscriptional level. *J. Nutr.* **126**:416-423, 1996.
- Timiras P.S. Neuroendocrinology of aging: retrospective current and prospective views. In: Neuroendocrinology of aging. J. Meites ed., Plenum Press, New York, NY, 1983.
- Timiras P.S. Introduction: aging as a stage in the life cycle. In: Physiological basis of aging and geriatrics, 2nd ed., P.S. Timiras ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1994.
- Törma H., Valquist A. Biosynthesis of 3-dehydroretinol (vitamin A₂) from all-*trans*-retinol (vitamin A₁) in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **85**:498-500, 1985.
- Törma H., Valquist A. Uptake of vitamin A and retinol-binding protein by human placenta in vitro. *Placenta* **7**:295-305, 1986.
- Törma H., Valquist A. Retinol esterification by mouse epidermal microsomes: evidence for acyl CoA:retinol acyltransferase activity. *J. Invest. Dermatol.* **88**:398-402, 1987.
- Tsutsumi C., Okuno M., Tannous L., Piantedosi R., Allan M., Goodman D.S., Blaner W.S. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **267**:1805-1810, 1992.
- Tuchweber B., Perea A., Ferland G., Yousef I.M. Dietary restriction influences bile formation in aging rats. *Life Sci.* **41**:2091-2099, 1987.

- Underwood B.A., Siegel H., Wiesell R.C., Dolinski M. Liver stores of vitamin A in a normal population dying suddenly or rapidly from unnatural causes in New York City. *Am. J. Clin. Nutr.* **23**:1037-1042, 1970.
- Underwood, B.A. Vitamin A in animal and human nutrition. In: The Retinoids vol.1, M.B. Sporn, A.B. Roberts and D.S. Goodman eds., Academic Press, Orlando, 1984.
- Valquist A. Metabolism of the vitamin A-transporting protein complex: turnover of retinol-binding protein, prealbumin and vitamin A in a primate (*Macaca irus*). *Scan. J. Clin. Lab. Invest.* **30**:349-360, 1972.
- van Bennekum A.M., Blaner W.S., Seifert-Bock I., Moukides M., Brouwer A., Hendricks H.F.J. Retinol uptake from retinol-binding protein (RBP) by liver parenchymal cells in vitro does not specifically depend on its binding to RBP. *Biochemistry* **32**:1727-1733, 1993.
- van Remmen H., Ward W., Sabia R.V., Richardson A. Gene expression and protein degradation. In: Handbook of Physiology, sect. 11 Aging. E.J. Masoro ed., Oxford University Press, New York, NY, 1995.
- van Wauwe J., van Nyen G., Coene M-C., Stoppie P., Cools W., Goossens J., Borghgraef P., Janssen P.A.J. Liarazole, an inhibitor of retinoic acid metabolism, exerts retinoic-mimetic effects in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**:773-779, 1992.
- Vasios G., Mader S., Gold J.D., Leid M., Lutz Y., Gaub M.-P., Chambon P., Gudas L. The late retinoic acid induction of laminin B1 gene transcription involves RAR binding to the responsive element. *EMBO J.* **10**:1149-1158, 1991.
- Walford R.L. The immunological theory of aging, Munksgaard, Copenhagen, 1969.
- Wang, X.D., Krinsky, N.I., Russell, R.M. Retinoic acid regulates retinol metabolism via feedback inhibition of retinol oxidation and stimulation of retinol esterification in ferret liver. *J. Nutr.* **123**:1277-1285, 1993.
- Wang, X.D., Krinsky, N.I., Benotti P.N., Russell, R.M. Biosynthesis of 9-*cis*-retinoic acid from 9-*cis*- β -carotene in human intestinal mucosa in vitro. *Arch. Biochim. Biophys.* **313**:150-155, 1994.
- Wang X., Penzes P., Napoli J.L. Cloning of a cDNA encoding an aldehyde dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*: recognition of retinal as substrate and role in retinoic acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **271**:16288-16293, 1996.
- Ward W.F. Food restriction enhancement of the proteolytic capacity of aging rat liver. *J. Gerontol.* **43**:B121-B124, 1988.

- Ward W.F., Richardson A., Effect of age on liver protein synthesis and degradation. *Hepatology* **14**:935-948, 1991.
- Warner H.R., Fernandes G., Wang E. A unifying hypothesis to explain the retardation of aging and tumorigenesis by caloric restriction. *J. Gerontol.* **50A**:B107-B109, 1995.
- Wei L-N., Lee C-H., Shang S-L., Chu Y-S. Pathogenesis in transgenic mice expressing bovine cellular retinoic acid-binding protein. *Dev. Growth Differ.* **34**:479-488, 1992.
- Wei S., Episkopou V., Piantedosi R., Maeda S., Shimada K., Gottesman M.E., Blaner W.S. Studies on the metabolism of retinol and retinol-binding protein in transthyretin-deficient mice produced by homologous recombination. *J. Biol. Chem.* **270**:866-870, 1995.
- Weindruch R., Walford R.L. Dietary restriction in mice beginning at one year of age: effects on lifespan and spontaneous cancer incidence. *Science* **215**:1415-1418, 1982.
- Weindruch R. The retardation of aging by caloric restriction: studies in rodents and primates. *Toxicol. Pathol* **24**:742-745, 1996.
- Weissman A.M. et al. Only high affinity receptors for interleukin-2 mediate internalization of ligand. *Proc, Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**:1463-1470, 1986.
- Weraarchakul N., Strong R., Wood W.G., Richardson A. The effects of aging and dietary restriction on DNA repair. *Exp. Cell Res.* **181**:197-202, 1989.
- Williams G.R., Harney J.W., Moore D.D., Larsen P.R., Brent G.A. Differential capacity of wild type promotor elements for binding and *trans*-activation by retinoic acid and thyroid hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1527-1537, 1992.
- Woo J., Ho S., Mak Y.T., Shek C.C. Swaminathan R. Vitamin A and E status in healthy elderly Chinese in Hong Kong. *Eur. J. Clin. Nutr.* **42**:689-695, 1988.
- Yamada M., Blaner W.S., Soprano D.R., Dixon J.L., Kjeldbye H.M., Goodman D.S. Biochemical characteristics of isolated rat liver stellate cells. *Hepatology* **7**:1224-1229, 1987.
- Yang Yen H-F., Zhang X-K., Graupner G., Tzukerman M., Sakamoto B., Karin M., Pfahl M. Antagonism between retinoic acid receptor and AP-1: implication for tumor promotion and inflammation. *Nature New Biol.* **3**:1216-1219, 1991.

- Yost R.W., Harrison E.A., Ross A.C. Esterification by rat liver microsomes of retinol bound to cellular retinol-binding protein. *J. Biol. Chem.* **263**:18693-18701, 1988.

- Yu B.P. et al. Life span study of SPF Fisher 344 male rats fed ad libitum or restricted diets: longevity, growth, lean body mass and disease. *J. Gerontol.* **37**:130-141, 1982.

- Yu B.P., Masoro E.J., McMahan C.A. Nutritional influences on aging of Fisher 344 rats: I. Physical, metabolic and longevity characteristics. *J. Gerontol.* **40**:657-670, 1985.

- Yu B.P. Food restriction research: past and present status. *Aging* **4**:349-371, 1990.

- Yu B.P., Suescun E.A., Yang S.Y. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: Modulation by dietary restriction. *Mech. Ageing Dev.* **65**:17-33, 1992.

- Yu B.P. Putative intervention. In: Handbook of Physiology, sect. 11 Aging. E.J. Masoro ed., Oxford University Press, New York, NY, 1995.

- Yu B.P. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Rad. Biol. Med.* **21**:651-668, 1996.

- Yu B.P., Yang Y. A critical evaluation of free radical theory of aging: a new proposal of oxidative stress hypothesis. *Ann. NY Acad. Sci.* **786**:1-11, 1996.

- Zachman R.D., Dunagin P.E. Jr., Olson J.A. Formation and enterohepatic circulation of metabolites of retinol and retinoic acid in bile duct-cannulated rats. *J. Lipid Res.* **7**:3-9, 1966.

- Zile M.H., Inhorn R.C., DeLuca H.F. Metabolism of all-trans-retinoic acid in bile: Identification of all-trans-retinoyl- and 13-cis-retinoyl-glucuronides. *J. Biol. Chem.* **257**:3544-3550, 1982.

ANNEXES

ANNEXE I

Composition des diètes^a

Ingrédients	AL et DR	DR ⁺
	<i>en % du poids</i>	
Caséine	22.0	22.0
Sucrose	48.5	48.5
Fécule de maïs	15.0	15.0
Huile de maïs	5.0	5.0
Cellulose	3.8	0.0
Minéraux ^b	3.5	5.9
Vitamines ^c	2.2	3.7
Energie (kJ/g)	16.95	16.95
Rétinyl palmitate (nmol/g)	20.8	34.8

a: basée sur la diète contrôle Teklad #TD 89248 (Teklad Test Diets)

b: AIN-76 Mineral Mixture (ICN Biochemicals Inc.)

c: ICN Vitamin Diet Fortification Mixture (ICN Biochemicals Inc.)

ANNEXE II

Contribution à d'autres travaux non-inclus dans la thèse

COMPARATIVE EFFECT OF DIETARY RESTRICTION INITIATED IN ADULTHOOD VS AFTER WEANING ON RETINOL TRANSPORT AND HEPATIC STORAGE IN AGED RATS. S. Chevalier, G. Ferland and B. Tuchweber. Dept. of Nutrition, Univ. of Montréal, Qué., Canada, H3C 3J7.

Recent studies have shown that dietary restriction (DR) (without malnutrition) when implanted soon after weaning (DRW) modifies lymphatic absorption, hepatic storage and the tightly regulated plasma transport of retinol. It was demonstrated that initiation of DR in adulthood (DRA) was as effective as DRW in delaying the appearance of age-related diseases and increasing the longevity of laboratory rodents. Initiation of DR after the developmental period of life circumvents the interference with growth and maturation processes inherent to the classic DR model. We thus studied retinol hepatic storage and transport in aged (20-22 months) female and male Sprague-Dawley rats subjected to a 40%-DR implanted at 8 months of age. Plasma retinol levels were decreased by 50% in DRA rats when compared to ad libitum-fed rats. The decrease was observed in both male and female rats and was of the same magnitude as that seen in DRW. These low levels of retinol would be indicative of vitamin A deficiency. However, retinoid hepatic concentration (per g liver) and content (per whole liver) were significantly higher in DRA and DRW than in ad libitum-fed controls, despite similar daily intake of vitamin A. These data suggest that restriction of the energy intake, from weaning or after the growth period, results in a similar perturbation of plasma retinol regulation, which appears to be sex-independent. This effect probably occurs through alterations of retinol binding-protein metabolism. (Supported by NSERC)

Résumé publié dans *FASEB Journal* 11:A176, 1997.

Journals of Gerontology 1998 (article accepté)

**ROLE OF GLUTATHIONE IN THE BENEFICIAL EFFECT OF DIETARY
RESTRICTION ON BILE FORMATION IN YOUNG, MATURE AND OLD RATS**

**Guylaine Bouchard¹, Stéphanie Chevalier², Aline Péréa², Claude Barriault²,
Ibrahim M. Yousef^{1,3}, and Béatriz Tuchweber^{2,3}.**

**Departments of ¹Pharmacology and ²Nutrition
Université de Montréal and ³Centre de
Recherche Pédiatrique, Hôpital Ste-Justine,
Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5**

Short running title: Bile GSH in aging-diet-restricted rats

ABSTRACT

We investigated the contribution of bile salts and glutathione (GSH) to the generation of bile flow in young, mature and old female Sprague-Dawley rats, either fed ad libitum (AL) or subjected to a 40%-dietary restriction (DR) which was supplemented or not with vitamins and minerals, starting from weaning. An age-related decline in bile flow was observed in the AL group. DR increased bile flow compared to age-matched AL rats, resulting in a 2-fold increase in the old animals. This was associated with a statistically significantly higher biliary GSH secretion rate and a moderate increase in the bile salt secretory rate. The apparent GSH-dependent flow was significantly increased in DR groups of all ages. Hepatic GSH concentration was closely related to the GSH secretion rate. These results indicate that the increase in biliary GSH content produced by DR is the major mediator of the increased bile flow, resulting in enhanced GSH and GSH-derived thiols supply to the intestinal lumen.

Index Terms: Bile flow, bile salt-independent flow, glutathione, liver, age, food restriction

INTRODUCTION

Liver and hepatobiliary functions are known to be impaired by the aging process, resulting in decreased resistance to stress and increased risk of hepatotoxicity (Carrillo et al., 1989; Vogt and Richie, 1993). Dietary restriction (DR) has been shown to be an effective means of preventing or limiting these age-related changes in hepatic function. With regard to bile formation, DR was shown to prevent the decrease in bile flow observed in ad-libitum (AL)-fed old rats (Tuchweber et al., 1987) as well as the age-related decline in bile salt (BS) secretion rate.

A large fraction of the bile flow is thought to be generated through the concentrative canalicular secretion of non-diffusible components leading to paracellular and transcellular osmotic attraction of water and electrolytes. The BS are the best-known osmotic biliary components, but cannot account for the entire bile flow, leading to the concept of the BS-independent fraction of bile flow. Changes in the BS secretion and profile (Uchida et al., 1978; Tuchweber et al., 1987; Ferland et al., 1989) have not been able to fully explain the higher bile flow observed in aging DR animals, suggesting that DR may influence the BS-independent flow (Tuchweber et al., 1987).

The mechanisms involved in the generation of the BS-independent flow fraction of bile still remain obscure. However, glutathione (GSH), as BS, has been shown to be an osmotic factor involved in bile formation and a major contributor to the BS-independent flow (Ballatori and Truong, 1989; 1992). In addition to its contribution to bile flow generation, GSH is also a potent antioxidant (Shan et al., 1990) and its biliary secretion provides a supply of GSH and GSH-derived thiols, including cysteine, to the intestine. This is particularly important since GSH, whose intestinal absorption is limited (Vendemiale et al., 1994), is known to be degraded in the biliary tree by enzymatic reactions initiated by the ectoenzyme gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) (Ballatori et al., 1988). In the rat, inhibition of GGT was reported to increase GSH biliary content, but did not modulate total GSH-derived biliary thiols (Gregus et al., 1987). This suggests that GSH biliary secretion may serve as a source of thiols to the intestinal lumen. Given the known modulation of GSH homeostasis by aging and DR (Laganieri and Yu, 1989; Vina et al., 1992; Vogt and Richie, 1993), the current study investigates the role of biliary GSH in the decreased BS-independent flow and the supply of thiols to the intestinal lumen in aging rats, as well as its contribution to the beneficial effect of DR.

MATERIALS AND METHODS

Diets, experimental design and surgical procedures

Female Sprague-Dawley rats (Charles River, St. Constant, Québec, Canada) were housed individually and randomly separated into 3 diet groups soon after weaning and were raised until the age of 3 (young), 12 (mature) and 22 (old) months. They were either fed AL (Teklad semi-synthetic diet #89248) or maintained on a 40%-DR of all nutrients (R) or a 40%-DR of macronutrients only (R+) so that daily intake of vitamins and minerals was comparable to controls. The amount of food given to DR-rats was calculated from the mean amount of food consumed by the controls (by weight). DR-rats were fed just before dark so that they would eat during the same period as controls. Rats were weighed once a week and food intake was monitored twice a week during the growth period and bi-weekly thereafter. All the rats were housed in the same room with controlled temperature (22°C), humidity and lighting cycle of 12 hours, starting at 4:00 am. Animal protocols and surgical procedures were revised and approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal in compliance with guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

At selected ages, each experimental group was randomly divided in two subgroups. In the first subgroup, the liver and intestine were excised following ether anesthesia, without prior bile collection to avoid possible changes due to interrupted entero-hepatic circulation. Tissues were rapidly frozen in liquid nitrogen and kept at -80° C. To evaluate biliary function, rats of the second subgroup were anesthetized with sodium pentobarbital (48 mg/kg, i.p.) before cannulation of the common bile duct with a PE-10 catheter. Experiments were started at the same time of the day for all animals to avoid diurnal variations. Body temperature was maintained at 37° C with the use of a rectal probe coupled to a thermostatically-controlled heat lamp. Bile was collected with a short biliary cannula in ice-cold pre-weighed tubes protected from light for 120 minutes at 15-minute intervals. Immediately after each period of bile collection, an aliquot was immediately acidified to process for GSH determination while residual bile was frozen at -80° C until required for analysis. Pilot experiments revealed that over the physiological range of biliary GSH examined, determination of GSH from bile acidified immediately after the bile collection period resulted in a value of $90.4 \pm 1.7\%$ (n=129, mean obtained from individual percent change) compared to values obtained with direct biliary collection in acid, previously proposed to limit GSH degradation and oxidation (Akerboom and Sies, 1981). In addition, oxidized glutathione (GSSG) levels were not significantly altered by our procedures (0.096 ± 0.028 versus 0.103 ± 0.026 nmol/min.g liver for bile acidified immediately after the bile collection period and bile directly collected in tubes containing 100 µl of 5% sulfosalicylic acid, respectively). This procedure was chosen since it also allowed the determination of other biliary components in residual bile.

Analysis and calculations

Bile volume was measured gravimetrically, assuming a density of 1 g/ml. Total biliary BS were determined enzymatically by the Weber et al. procedure (1972) using 3-alpha-hydroxy steroid dehydrogenase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Biliary cholesterol was extracted from bile by the Blight and Dyer method (1959) and determined

with a kit using cholesterol oxidase (Boeringer-Mannheim, Montreal, Quebec, Canada). Total biliary phospholipids were evaluated by measuring inorganic phosphate according to Bartlett's method (1959) after digestion of biliary content in perchloric acid (Galliard et al., 1965). Total biliary bilirubin was assessed with a commercial kit obtained from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Biliary GGT activity was determined following Dierickx's technique (1981). Since GSH is known to be partly degraded into thiols derivatives in bile, which are not importantly reabsorbed in the rat (Gregus et al., 1987), proper determination of its rate of secretion necessitates inhibition of GGT. However, since the use of a GGT inhibitor could alter biliary physiology, we choose to analyze reduced thiols to estimate GSH in bile following Tietze's non recycling modification (1969) of Ellman's procedure (1959). This technique was also employed to determine GSH in liver and intestine as it offers good estimates of GSH tissue levels (95% of thiols in the liver) (Gregus et al., 1987; Guyrasics et al., 1991). GSSG was estimated as the difference between total disulfide content (determined by the same method following NaBH_4 reduction of the acidified material) (Narayan and Roy, 1992; Sedlak and Lindsay, 1986) and reduced thiols.

The BS-independent flow and the GSH-independent flow were determined by the extrapolation to zero BS or GSH secretion of the linear relation between bile flow and BS or GSH respectively (Boyer and Klatskin, 1970; Ballatori and Truong, 1989; 1992; Bouchard et al., 1994). Since results of BS and GSH analysis did not show significant differences between R and R+ groups, the groups were combined for the purpose of estimating the various components of bile flow. The apparent choleric activity of BS or GSH was obtained as the slope of the previous relations. The BS and the GSH-dependent flows were estimated by multiplying BS secretion rate or GSH secretion rate with the apparent choleric activity. The remaining portion of the bile flow, the "not BS, not GSH-dependent flow" was estimated as the difference between total bile flow and the sum of the BS- and of the GSH-dependent flows.

Statistical analysis

The values were evaluated by two-way analysis of variance (ANOVA) (Age X Diet), except if otherwise stated. When a significant interaction effect was observed (significance lower or equal to 0.05), Duncan's test was used to determine the differences between groups and a *p* value lower than 0.05 was considered significant. To analyse the parameters of the regressions (intercept and slope), five orthogonal contrasts were constructed to obtain estimates and their variances. These contrasts were designed to test for the effects of age, diet and the age by diet interaction. The tests are based on the asymptotic distributions of the parameter estimates from the regressions which are normal; for the variances their estimates were used. Since the six regressions are independent, the five contrasts correspond to a decomposition into single degree of freedom sums of square in an ANOVA.

RESULTS

Mortality rate, liver and body weights

The mortality rate was 50% in the AL rats and 15% in the combined DR groups at the time of surgery in the 22 month-old animals. The deaths occurred spontaneously and autopsies revealed that they were mainly caused by renal disease.

There was a significant age, diet, and age by diet effect on both body and liver weights ($p < 0.0001$ in all cases). Mature rats of all dietary groups exhibited an increase in both body weight (462±20, 265±7 and 243±6 for AL, R and R+ groups respectively) and liver weight (11.5±0.8, 7.8±0.4 and 7.7±0.3 for AL, R and R+ groups respectively) when compared to young rats (Body weight: 240±8, 193±3 and 185±2 for AL, R and R+ respectively; Liver weight: 6.8±0.3, 6.2±0.2 and 5.9±0.2 for AL, R and R+ respectively). In the AL rats, both parameters continued to increase with age, resulting in significantly higher weights at 22 months (Body weight of 547±72 and liver weight of 15.7±2.6) compared to mature rats, while the DR groups showed stabilized parameters (Body weight of 260±8 and 261±6 for R and R+ respectively; liver weight of 7.6±0.4 and 7.9±0.2 for R and R+ respectively). The liver-to-body weight ratio was not significantly changed by the aging process ($p = 0.13$, mean of 2.7±0.9 in AL groups), which is indicative of maintained liver mass per unit of body weight. However, DR resulted in an increased liver-to-body weight ratio ($p < 0.0001$, mean of 3.1±0.5 in DR groups), which only reached statistical significance in mature animals.

Bile flow and biliary parameters

Figure 1a shows an age effect on bile flow, which was statistically significantly decreased in the 12 and 22 month-old AL rats. Both R or R+ diets improved bile flow, resulting in a significantly higher bile flow in mature and old DR rats when compared to AL rats.

The biliary BS secretion rate was not significantly modified with age (Figure 1b). However, DR was found to improve biliary secretion of BS in all groups, although not to a statistically significant degree in any but in the youngest R group. Biliary lipids (phospholipids and cholesterol) followed BSSR in all groups but no statistically significant effects of age or diet in either the phospholipid secretion rate, cholesterol secretion rate, or in the phospholipids- or cholesterol-to-BS molar ratio were observed (results not shown). In addition, the bilirubin secretion rate was not significantly altered by the aging process, and was not modulated by DR (results not shown).

The effect of aging and of DR on the biliary secretion of GSH is depicted on Figure 2. No age effect was observed with regard to GSH biliary secretion (Figure 2a). However, a marked increase in GSH secretion rate was observed in DR rats compared to age-matched controls, which was statistically significant in the mature and old groups. No difference was noted between R and R+ groups. An age by diet interaction was found on GSSG biliary secretion, which was significantly increased only in mature and old rats of the R diet (Figure 2b). Biliary GGT activity was also evaluated in young and old groups. No significant variations with age or diet was observed among the groups (2.29±1.00,

3.24±0.81 and 2.46±0.91 $\mu\text{U}/\text{min}\cdot\text{g}$ liver for the young AL, R and R+ groups respectively and 1.30±0.57, 2.65±0.92 and 3.29±1.12 $\mu\text{U}/\text{min}\cdot\text{g}$ liver in the old AL, R and R+ groups respectively).

Contribution of BS and GSH to bile formation

Both the apparent BS-independent flow and GSH-independent flow showed a significant and progressive decrease with age in the AL groups (Table 1 and Table 2). A significantly higher BS-independent flow was found in DR (R and R+) rats compared to AL rats in all age groups (Table 1). DR also prevented the age-related decline in BS-independent flow. Although DR showed no effect against GSH-independent flow, it also limited the decline observed on this parameter from mature to old age (Table 2).

No statistically significant effect of age or diet was observed on the apparent choleric activity of BS. GSH choleric activity increased with age in both AL and R groups, although the age effect was limited by DR in the old group (Table 1 and Table 2).

Evaluation of the direct contribution of BS and GSH to bile flow generation revealed no significant change with aging or DR in regard to the BS-dependent flow (Figure 3), however, the bile flow generated from biliary GSH was found to increase with age (Figure 4). At all ages, DR groups exhibited a marked and statistically significant increase in the GSH-dependent flow compared to matched AL groups (Figure 4). In general, GSSG secretion did not correlate with bile flow and when a correlation was obtained, it did not appear to contribute significantly to bile flow generation (data not shown).

The residual portion of the bile flow, namely the "not BS not GSH-dependent flow", of which the osmotic factors or other processes related to bile formation are not characterized here, also appeared to be affected by age and diet. The estimation of the flow independent of BS and GSH revealed a decline with age in both AL and DR groups, representing 0.63, 0.33 and -0.23 for AL groups and 0.46, 0.07 and 0.18 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ liver for DR groups in young, mature and old rats respectively. Thus, the decrease of this biliary fraction appeared to be more marked in the DR groups in young and mature animals. However, DR groups maintained levels of secretion similar to that of mature rats at old age, while this fraction of bile flow continued to decline in AL rats.

Concentration of GSH in liver and intestine

As shown in Figure 5, no effect of aging on the hepatic concentration of reduced or oxidized GSH was observed in the AL-group. DR resulted in a significant and specific increase in hepatic reduced GSH concentrations at all ages when compared to corresponding AL groups. In contrast, DR did not increase either the oxidized or reduced GSH concentrations in intestinal cells (Figure 6). Note however that the GSH supply to intestinal lumen from bile was increased by DR (34.63 ± 2.19 versus 26.6 ± 2.7 nmol/min in intestinal lumen, $p < 0.05$ or 11.56 ± 0.69 versus 8.61 ± 0.77 nmol/min.g intestine respectively for DR and AL groups, $p < 0.05$).

DISCUSSION

The physiological processes related to the beneficial effect of DR on bile formation, and particularly on the BS-independent flow fraction, had not been investigated even though the previously observed biliary changes indicated that improvements in bile secretion appeared to be mainly related to the BS-independent flow (Tuchweber et al., 1987). This study was designed to define the role of GSH, now identified as a generator of a portion of the BS-independent flow (Ballatori and Truong, 1989; 1992), in such processes. The data obtained show that DR resulted in a marked increase of biliary GSH content in old but also in mature and young rats, which appears responsible for a major part of the observed increased bile flow resulting from DR. Hepatic GSH content, which is known to modulate biliary GSH secretion in the rat (De Leve and Kaplowitz, 1991), was increased in DR groups of all ages, and correlated well with the GSH biliary secretion rate. Thus, improved BS-independent flow through higher GSH secretion appears to be the major factor in higher bile formation, and in the maintenance of bile secretion in aging DR rats. The higher biliary tract and intestinal availability of GSH and derived thiols during DR might also contribute to some of the other beneficial effects of DR.

As expected from previous studies from this and other laboratories (Uchida et al., 1978; Kroker et al., 1980; Kitani et al., 1981; Tuchweber et al., 1987; Ferland et al., 1989; Vogt and Richie, 1993), bile formation decreases with age in AL rats. This study allowed us to clarify the contribution of three fractions of the bile flow, namely the BS-dependent flow, the GSH-dependent flow and the "not BS, not GSH-dependent flow", to the physiological decline in bile flow observed in aging. Under our conditions, as in another similar colony of rats (Bouchard et al, 1997), neither the BS-dependent flow nor the GSH-dependent flow were decreased with aging, the physiological decline observed being solely mediated by the presently undefined "not BS, not GSH-dependent flow" (or the BS-independent flow not dependent on GSH).

DR was highly effective in abolishing the age-related decrease in bile flow and it also stimulated bile formation in young animals. This effect of DR was observed both with or without the 40% restriction in vitamins and minerals, indicating a primary role for energy intake in the physiological stimulation of bile formation. The only difference observed between these two diets was the increased biliary GSSG levels in mature and old groups subjected to the diet restricted in vitamins and minerals.

Characterization of the various fractions of bile flow following DR revealed that its effect on bile formation was mostly related, under our conditions, to higher GSH-dependent flow. DR exerted its effect mainly through increased GSH biliary secretion. The major effect of DR on the secretion of GSH itself (versus other thiols) was confirmed in other similar experiments by the direct determination of GSH secretion rate (using GSH reductase, technique of Tietze, 1969) (unpublished observations). The extent of the increases in biliary GSH secretion, GSH-dependent flow, and hepatic GSH concentrations was similar at all ages, despite the very different duration of the diet intervention. This suggests that the beneficial effect of DR on biliary GSH might be produced by short term DR.

The physiological role (s) and significance of biliary GSH availability are not clear, and the implications of higher hepatic and biliary secretion of GSH still need to be

investigated. Nonetheless, it is recognized that dietary GSH precursors and endogenous GSH production by the liver represent the main contributors to the total GSH pool. Biliary secretion of GSH represents about 50% of the total hepatic GSH secreted (Ballatori et al., 1989), which is considerable since the liver is the main source of plasma GSH (De Leve and Kaplowitz, 1991). Higher steady-state values of hepatic GSH concentrations following life-long DR, possibly the result of adaptation to lower dietary intake of GSH precursors, could enhance resistance to major oxidative stressors and possibly protect against drug-induced hepatotoxicity (Chen et al., 1988). In addition, bile is a source of potentially reactive metabolites and the higher levels of GSH could contribute to limit electrophilic damage (Chipman, 1982). Furthermore, the rich source of biliary GSH may maintain high intestinal luminal GSH and derived reduced thiols. These can neutralize peroxidized lipids (Aw, 1994) and reactive radicals also known to be involved in carcinogenesis (Abate et al., 1990), and could thus be a factor in the known beneficial effect of DR against intestinal carcinogenesis (Holt et al., 1991; Steinbach et al., 1993). Finally, the higher biliary supply of GSH and absorbable derived thiols to the intestine might be crucial in the preservation of GSH tissue levels through systemic redistribution. Maintenance of GSH tissues levels in aging DR animals (Laganriere and Yu, 1989; Lang et al., 1989) have been proposed to play a key role in the effect of DR on improved survival (Richie, 1992). Although not shown in mammals, such pivotal role of GSH in longevity is suggested by evidence that the administration of GSH precursors in old mosquitos increased tissue GSH concentrations and life span (Richie et al., 1987).

In summary, this study shows that DR stimulates the BS-independent flow through an increase in the biliary GSH content and associated GSH-generated bile flow. This effect of DR appears to be the main contributor to the improved bile flow observed in aging rats subjected to this diet. It remains to be determined if, in addition to the generation of bile flow, this higher supply of GSH to the intestinal lumen could also play a role in some other beneficial effects of DR on the aging process.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the gracious contribution of Dr. Urs Maag, Dept. of Mathematics and Statistics, University of Montreal to the statistical analysis, and in particular for the construction of the contrasts. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and by the Medical Research Council of Canada. It was presented in part at the Digestive Disease Week (San Diego, CA) and the International Symposium on Pediatric Gastroenterology and Nutrition (Montreal, Canada) meetings. GB and SC are recipients of Canadian Liver Foundation and of FCAR studentship awards, respectively.

All correspondence should be addressed to:

Dr. Beatriz Tuchweber
Département de Nutrition
Université de Montréal
C.P. 6128, succursale centre-ville
Montréal, Québec
Canada H3C 3J7

Telephone : (514) 343-6393
Fax: (514) 343-6103

REFERENCES

- Abate C.; Patel L.; Raucher F.J.; Curran T. Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249:1157-1161; 1990.
- Akerboom T. P.; Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol.* 77:373-82; 1981.
- Aw T. Y. Biliary glutathione promotes the mucosal metabolism of luminal peroxidized lipids by rat small intestine in vivo. *J. Clin. Invest.* 94:1218-1225; 1994.
- Ballatori N.; Jacob R.; Barrett C.; Boyer J. L. Biliary catabolism of glutathione and differential reabsorption of its amino acid constituents. *Am. J. Physiol.* 254:G1-G7; 1988.
- Ballatori N.; Truong A. T. Relation between biliary glutathione excretion and bile acid-independent bile flow. *Am. J. Physiol.* 256:G22-G30; 1989.
- Ballatori N.; Truong A. T.; Ma A. K.; Boyer J. L. Determinants of glutathione efflux and biliary GSH/GSSG ratio in perfused rat liver. *Am. J. Physiol.* 256:G482-G490; 1989.
- Ballatori N.; Truong A. T. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am. J. Physiol.* 263:G617-G624; 1992.
- Bartlett G. R. Phosphorous assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234:466-468; 1959.
- Blight E. G.; Dyer W. T. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917; 1959.
- Bouchard G.; Chevalier S.; Yousef I.M.; Ferland G.; Tuchweber B. Modulation of glutathione and bile salt secretion in bile by dietary restriction initiated after weaning and in adult rats. 16th International Congress of Nutrition, Montreal, Canada: 61; 1997.
- Bouchard G.; Yousef I. M.; Tuchweber B. Decreased biliary glutathione content is responsible for the decline in bile salt-independent flow induced by ethinyl estradiol in rats. *Toxicol. Letters* 74:221-233; 1994.
- Boyer J. L.; Klatskin G. Canalicular bile flow and bile secretory pressure: Evidence for a non-bile salt-dependent fraction in the isolated perfused rat liver. *Gastroenterology* 59:853-859; 1970.
- Carrillo M. C.; Kitani K.; Kanai S.; Sato Y.; Nobuko M.; Ohta M.; Otsubo K. Difference in the influence of diet on hepatic glutathione-S-transferase activity and glutathione content between young and old C57 black female mice. *Mech. Ageing Dev.* 47:1-15; 1989.

Chen T. S.; Richie J. P. Jr.; Lang C. A. Glutathione ester protects against glutathione deficiencies due to aging and acetaminophen. *Pharmacologist* 30:A78; 1988.

Chipman J. K. Bile as a source of potential reactive metabolites. *Toxicology* 25:99-111; 1982.

De Leve L. D.; Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 52:287-305; 1991.

Dierickx P. J. Urinary gamma-glutamyl transferase as an indicator of acute nephrotoxicity in rats. *Arch. Toxicol.* 47:209-215; 1981.

Ellman G. L. Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70-77; 1959.

Ferland G.; Tuchweber B.; Perea A.; Yousef I. M. Effect of aging and dietary restriction on bile acid metabolism in rats. *Lipids* 24:842-848; 1989.

Galliard T.; Mitchel R. H.; Hawthorne J. N. Incorporation of phosphate into diphosphoinositide by subcellular fractions from liver. *Biochim. Biophys. Acta* 106:551-563; 1965.

Gregus Z.; Stein A. F.; Klaassen C. D. Effect of inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase on biliary and urinary excretion of glutathione-derived thiols and methylmercury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242:27-32; 1987.

Guyrasics A.; Varga F.; Gregus Z. Glutathione-dependent biliary excretion of arsenic. *Biochem. Pharmacol.* 42:465-468; 1991.

Holt P. R.; Heller T. D.; Richardson A. G. Food restriction retards age-related biochemical changes in rat small intestine. *J. Gerontol.* 46:B89-B94; 1991.

Kitani K.; Zurcher C.; van Bezooijen K. The effect of aging on the hepatic metabolism of sulfo-bromophthalein in BN/Bi female and WAG/Rij male and female rats. *Mech. Ageing Dev.* 7:381-393; 1981.

Kroker R.; Hegner D.; Anwer M. S. Altered hepatobiliary transport of taurocholic acid in aged rats. *Mech. Ageing Dev.* 12:367-373; 1980.

Laganieri S.; Yu B. P. Effect of chronic food restriction in aging rats. II. Liver cytosolic antioxidants and related enzymes. *Mech. Ageing Dev.* 48:221-230; 1989.

Lang C. A.; Wu W. K.; Chen T.; Mills B. J. Blood glutathione: a biochemical index of life-span enhancement in the diet restricted Lobund-Wistar rat. *Prog. Clin. Biol. Res.* 287:241-246; 1989.

Narayan S.; Roy D. Changes in protein and nonprotein thiol content in bladder, kidney and liver of mice by the pesticide sodium-O-phenylphenol and their possible role in cellular toxicity. *Biochem. Intern.* 26:191-198; 1992.

Richie J. P. Jr.; Mills B. J.; Lang C. A. Correction of a glutathione deficiency in the aging mosquito increases its longevity. *P.S.E.B.M.* 184:113-117; 1987.

Richie J. P. Jr. The role of glutathione in aging and cancer. *Exp. Gerontol.* 27:615-626; 1992.

Shan X. Q.; Aw T. Y.; Jones D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther.* 47:61-71; 1990.

Sedlak J.; Lindsay R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25:192-205; 1968.

Steinbach G.; Kumar S. P.; Reddy B. S.; Lipkin M.; Holt P. R. Effects of caloric restriction and dietary fat on epithelial cell proliferation in rat colon. *Cancer Res.* 53:2745-2749; 1993.

Tietze F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27:502-522; 1969.

Tuchweber B.; Perea A; Ferland G.; Yousef I. M. Dietary restriction influences bile formation in aging rats. *Life Sci.* 41:2091-2099; 1987.

Uchida K.; Nomura Y.; Kadowaki M.; Takase H.; Takano K.; Takeuchi N. Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats. *J. Lipid Res.* 19:544-552; 1978.

Vendemiale G.; Palmieri V.; Palasciano G.; Altomare E. Effect of glutathione administration on hepatic, biliary and plasmatic glutathione levels in the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 29:1034-1038; 1994.

Vina J.; Sastre J.; Anton V.; Bruseghini L.; Esteras A.; Asensi M. Effect of aging on glutathione metabolism: Protection by antioxidants. *EXS* 62:136-144; 1992.

Vogt B. L.; Richie J. P. Jr. Fasting-induced depletion of glutathione in the aging mouse. *Biochem. Pharmacol.* 46:257-263; 1993.

Weber A. M.; Chartrand L.; Doyon L.; Gordon S.; Roy C. C. The quantitative determination of fecal bile acids in children by the enzymatic method. *Clin. Chim. Acta* 39:531-542; 1972.

FIGURE LEGENDS**Figure 1**

Effect of lifetime DR on a) bile flow and b) biliary secretion rate of bile salts in aging rats. Values are means \pm SEM of the two hour-period of bile collection, and were obtained from 3-8 animals per group (see Table 1 for details). Both the age of the animal and the diet significantly modified bile flow, while only diet produced a significant effect on the bile salt secretion rate. No interaction between the 2 parameters were observed. ^a different ($p<0.05$) from age-matched AL group, ^b different ($p<0.05$) from young group fed the same diet. No significant difference was obtained between R and R+ groups of the same age.

Figure 2

Effect of lifetime DR on the biliary secretion rate of a) reduced glutathione and b) oxidized glutathione during aging. Values are means \pm SEM of the two hour-period of bile collection, and were obtained from 3-8 animals per group (see Table 1 for details). The age of the animal did not affect the reduced GSH secretion rate while the diet parameter showed a significant effect, without interacting with age. In contrast, oxidized glutathione secretion was significantly affected by the age of the animal and by the type of diet, which produced a significant interaction on the oxidized glutathione secretion rate. ^a different ($p<0.05$) from age-matched AL group, ^b different ($p<0.05$) from young group fed the same diet, ^c different ($p<0.05$) from same age R+ group.

Figure 3

Effect of lifetime DR on the estimated bile salt dependent flow in aging rats. Values were obtained as described in "Materials and Methods" from individual bile collection period from 3-8 animals per group (see Table 1 for details). The age of the animal or the type of diet did not significantly affect the BS-dependent flow. No interaction between the 2 parameters was observed.

Figure 4

Effect of lifetime DR on the estimated glutathione-dependent flow in aging rats. Values were obtained as described in "Materials and Methods" from individual bile collection period from 3-8 animals per group (see Table 1 for details). The age of the animal and the type of diet both significantly affected the glutathione-dependent flow. No interaction between the 2 parameters was found. ^a different ($p<0.05$) from age-matched AL-group.

Figure 5

Effect of lifetime DR on reduced and oxidized glutathione concentrations in liver. Values are means \pm SEM from of 8, 7 and 7 young rats fed an AL, R and R+ diet respectively; 5, 3 and 6 mature rats fed an AL, R and R+ diet respectively; and of 6, 5 and 4 old animals fed an AL, R and R+ diet respectively. The type of diet significantly modulated the reduced but not the oxidized glutathione concentration. No age effect or age by diet interaction was observed for either reduced or oxidized GSH levels. ^a different ($p < 0.05$) from age-matched AL group. No significant difference was obtained between R and R+ groups of the same age.

Figure 6

Effect of lifetime DR on reduced and oxidized glutathione concentration in intestine. Values are means \pm SEM from of 8, 7 and 7 young rats fed an AL, R and R+ diet respectively; 5, 5 and 6 mature rats fed an AL, R and R+ diet respectively; and of 5, 5 and 4 old animals fed an AL, R and R+ diet respectively. The age of the animals significantly affected the reduced GSH concentration and an age by diet interaction was observed. Oxidized GSH was not significantly modulated by the age of the animals or the type of diet. ^a different ($p < 0.05$) from young group fed the same diet, ^b different ($p < 0.05$) from mature group fed the same diet, ^c different ($p < 0.05$) from age-matched AL group.

TABLE 1: EFFECT OF AGING AND LIFETIME DR ON BS-INDEPENDENT FLOW AND APPARENT CHOLERETIC ACTIVITY OF BS

	BS- INDEPENDENT FLOW ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ liver)	APPARENT CHOLERETIC ACTIVITY OF BS ($\mu\text{l}/\mu\text{mol}$)	p	r
<u>YOUNG</u>				
AL	0.87 \pm 0.07	33 \pm 6	<0.0001	0.63
R+R ⁺	1.14 \pm 0.06 ^c	21 \pm 3	<0.0001	0.62
<u>MATURE</u>				
AL	0.55 \pm 0.08 ^a	24 \pm 8	0.0042	0.52
R+R ⁺	0.85 \pm 0.09 ^{a,c}	32 \pm 5	<0.0001	0.61
<u>OLD</u>				
AL	0.30 \pm 0.07 ^{a,b}	33 \pm 6	<0.0001	0.78
R+R ⁺	1.15 \pm 0.12 ^c	17 \pm 6	0.0089	0.36

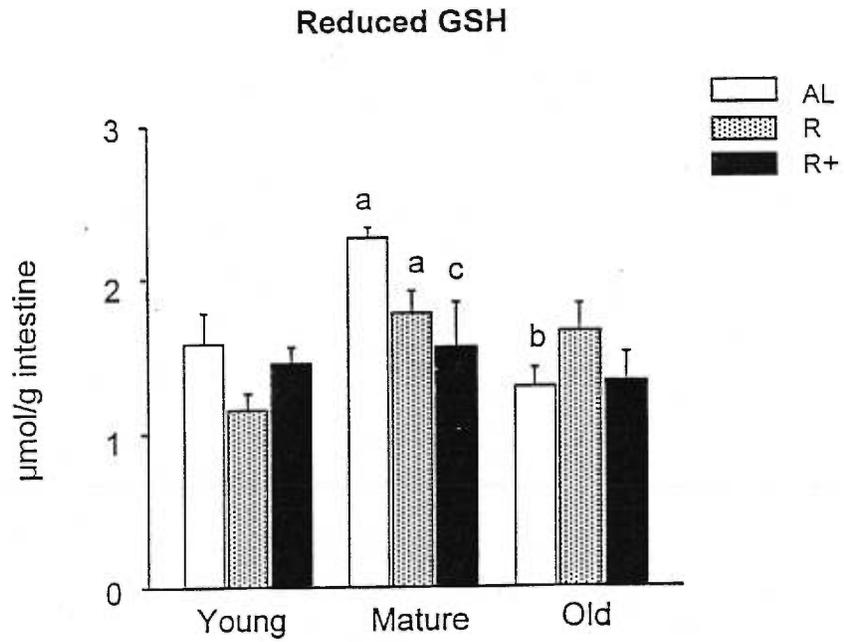
Values represent means \pm SEM and were obtained as described in "Materials and Methods" from the individual bile collection period of 8 AL and 14 DR (6R, 8R+) young rats; 5 AL and 9 DR (5R, 4R+) mature rats; and 3 AL and 8 DR (3R, 5R+) old rats. The *p* values represent the level of significance of the linear relation obtained between the bile flow and the bile salt secretion rate. The BS-independent flow was significantly affected by the age of the animals and by the diet. In addition, an interaction between age and diet was found. No age, diet or age by diet interaction was observed for the choleretic activity. ^a Different ($p < 0.05$) from young group fed the same diet, ^b different ($p < 0.05$) from mature group fed the same diet, ^c different ($p < 0.05$) from age-matched AL-group.

TABLE 2: EFFECT OF AGING AND LIFETIME DR ON GSH-INDEPENDENT FLOW AND APPARENT CHOLERETIC ACTIVITY OF GSH

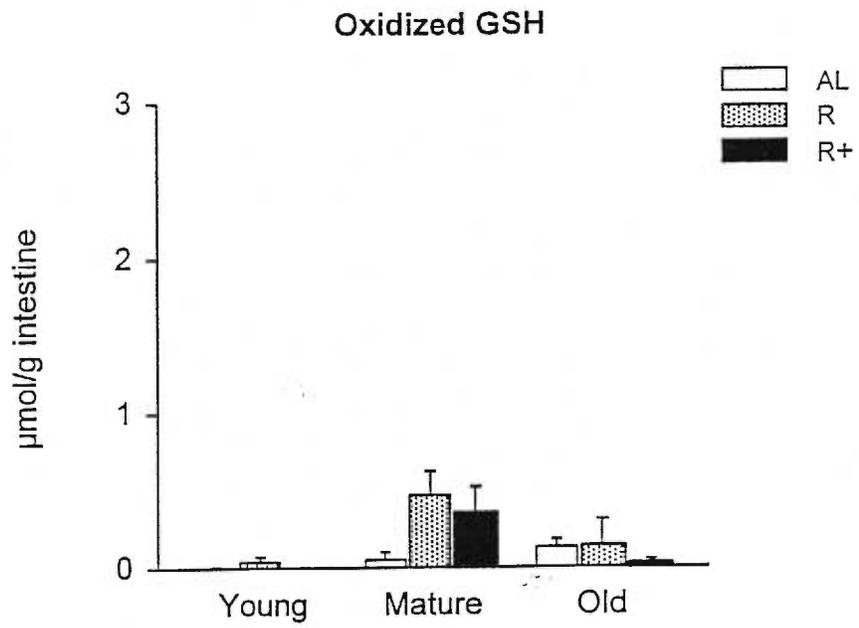
	GSH- INDEPENDENT FLOW ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ liver)	APPARENT CHOLERETIC ACTIVITY OF GSH ($\mu\text{l}/\mu\text{mol}$)	p	r
<u>YOUNG</u>				
AL	0.96 \pm 0.10	67 \pm 27	0.0180	0.32
R+R ⁺	0.81 \pm 0.05	114 \pm 8	<0.0001	0.85
<u>MATURE</u>				
AL	0.54 \pm 0.06 ^a	109 \pm 23	<0.0001	0.64
R+R ⁺	0.58 \pm 0.08 ^a	153 \pm 15 ^a	<0.0001	0.80
<u>OLD</u>				
AL	0.22 \pm 0.05 ^{a,c}	201 \pm 19 ^{a,c}	<0.0001	0.91
R+R ⁺	0.48 \pm 0.10 ^a	166 \pm 17 ^a	<0.0001	0.81

Values were obtained as described in "Materials and Methods" from the individual bile collection period of 3-8 animals per group (see Table 1 for details) and represent means \pm SEM. The *p* values represent the level of significance of the linear relation obtained between the bile flow and the glutathione secretion rate. Both the GSH-independent flow and the choleretic activity were significantly affected by the age of the animals and, although the type of diet did not induced a significant effect on these parameters, an interaction between age and diet was found. ^a Different (*p*<0.05) from young group fed the same diet, ^b different (*p*<0.05) from mature group fed the same diet, ^c different (*p*<0.05) from age-matched AL-group.

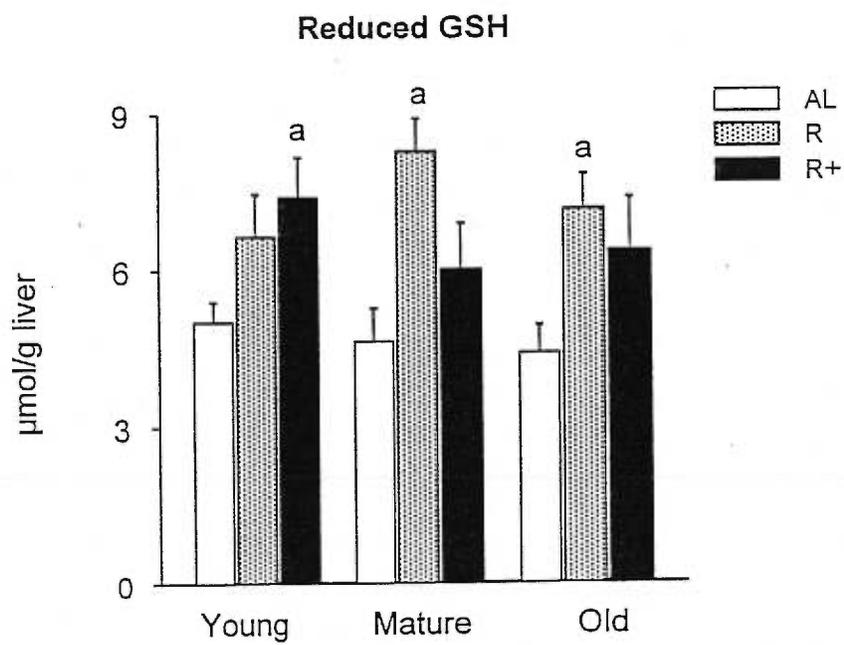
a)



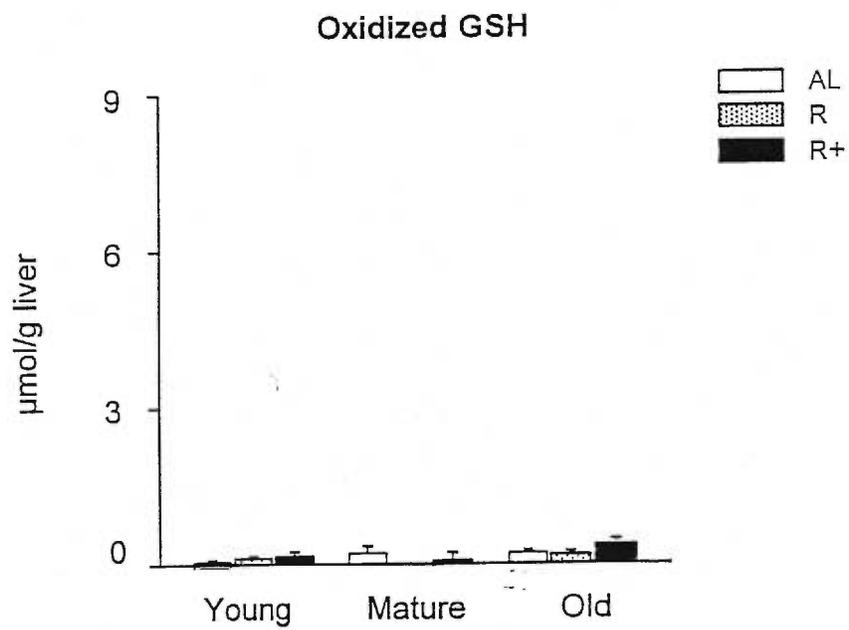
b)

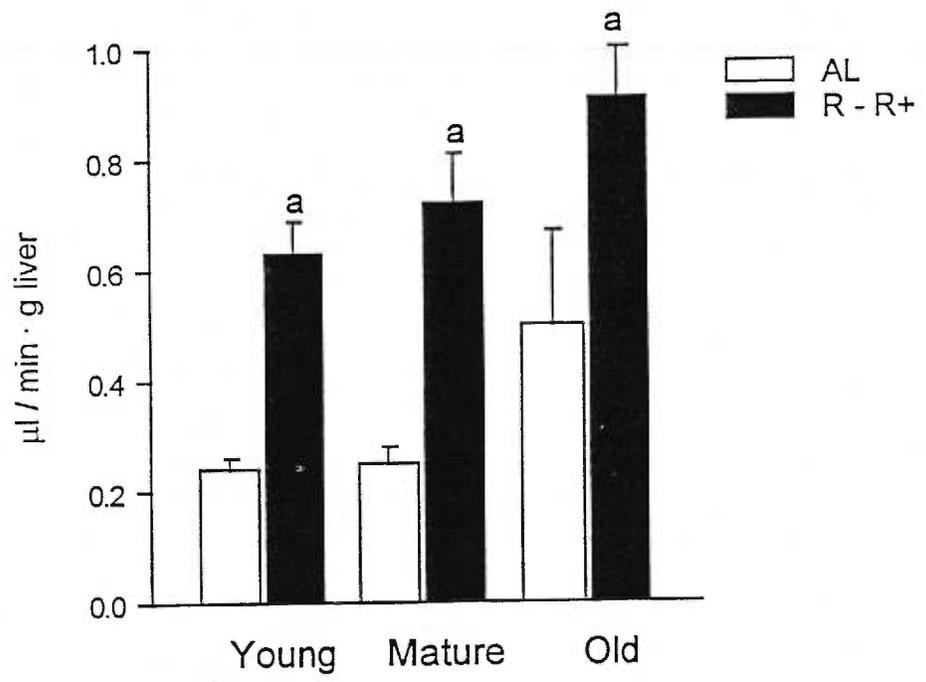


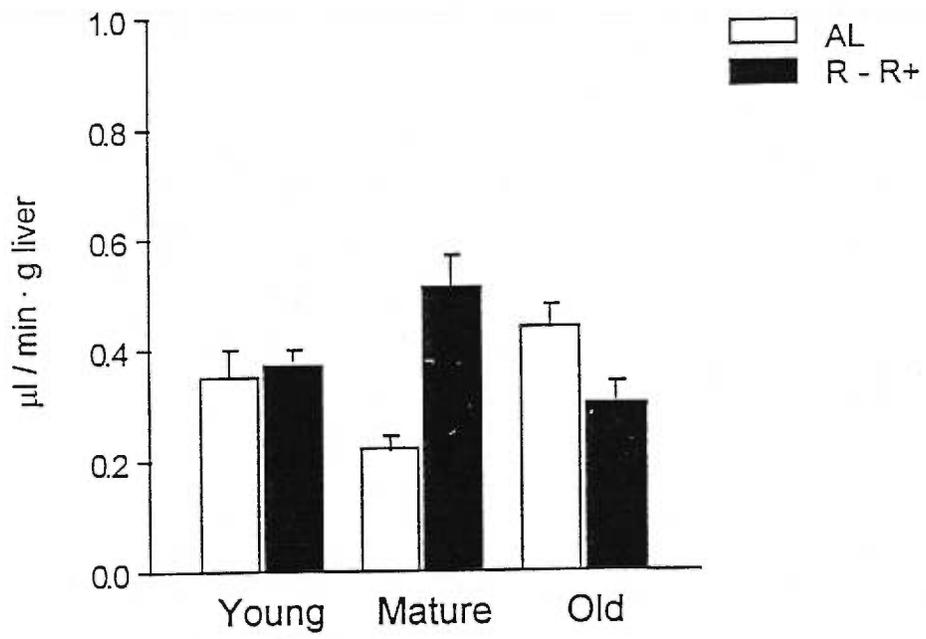
a)

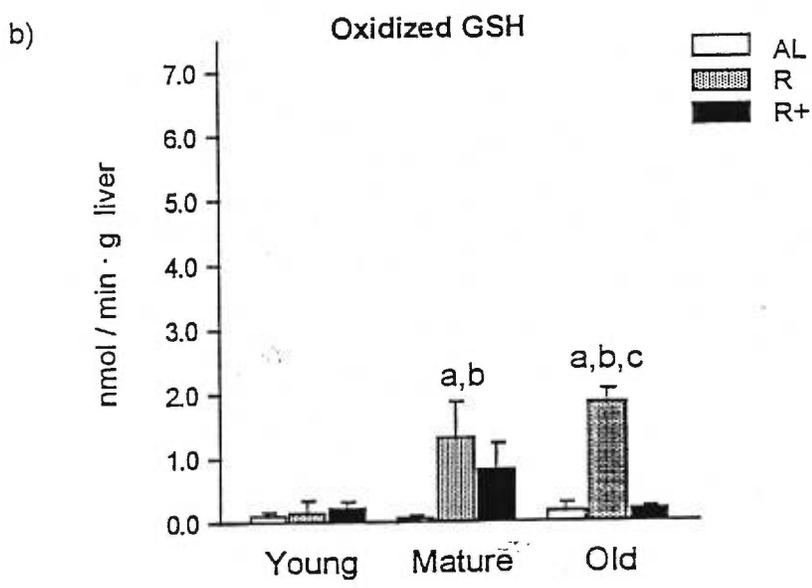
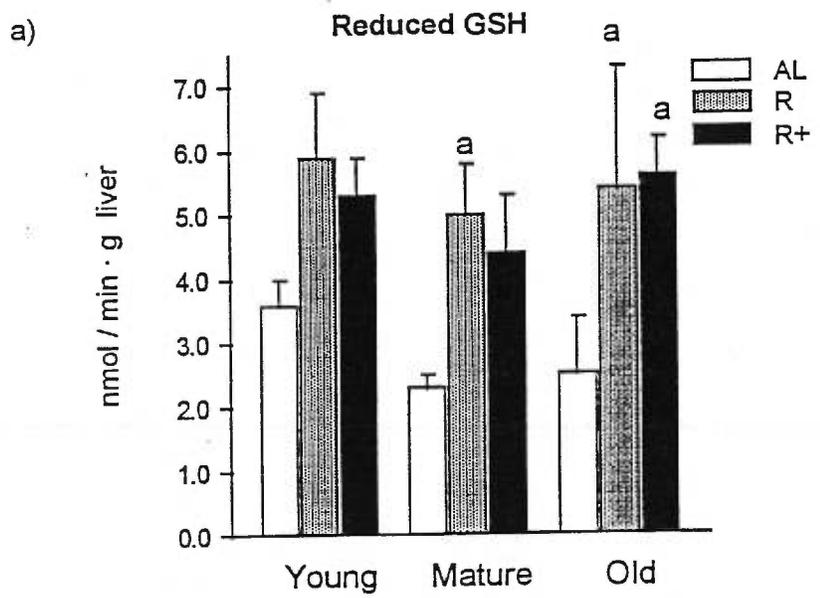


b)

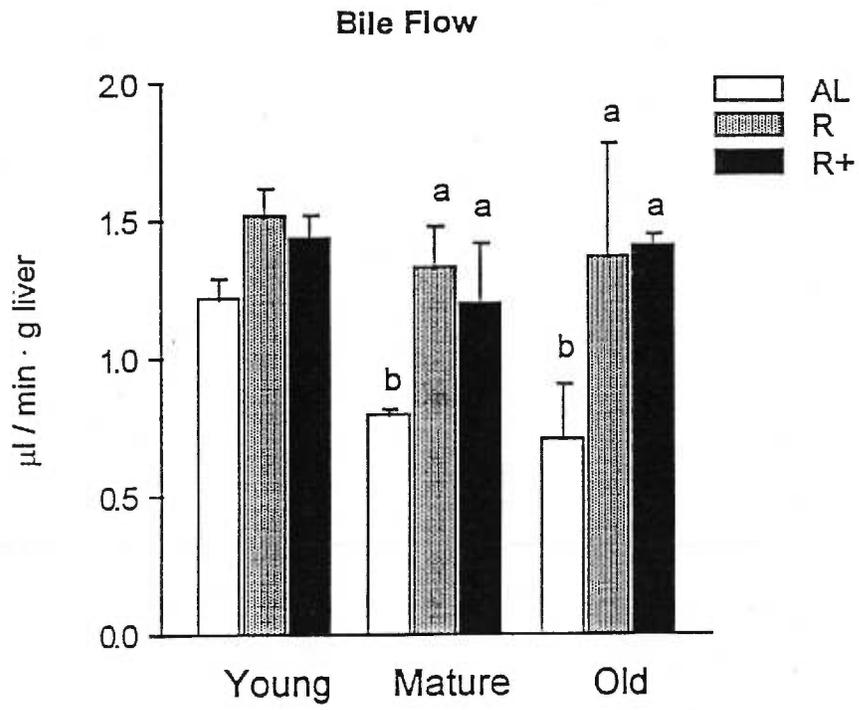








a)



b)

