

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2020

THESES 2020/TOU3/2068

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

par

BORDAT CLAIRE

**ENJEUX DE LA SUPPLÉMENTATION EN VITAMINE E DANS LES
HYPOCHOLESTEROLÉMIES PRIMAIRES INTESTINALES ET CRÉATION D'UN
MODÈLE D'ÉTUDE**

02/11/2020

Directeur de thèse : Pr. Peretti Noël

JURY

Président : Pr Jean-Edouard Gairin

1er assesseur : Pr Pierre Verhaeghe

2ème assesseur : Pr Elisa Boutet

3ème assesseur : Pr Noël Peretti



PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de
l'Université Paul Sabatier au 1^{er} Octobre 2020

Professeurs Émérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F. M.	Chimie Analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MASMANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GÉNISSON.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie – Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANAS.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie Pharmaceutique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie-Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie Analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDEC.	Pharmacie Clinique
Mme SÉRONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARÉLLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGÉ M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C. (*)	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie – Virologie
Mme COLACIOS C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
Mme DERAÈVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme ÉCHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme GADEA A.	Pharmacognosie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LE NAOUR A.	Toxicologie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MONTFERRAN S.	Biochimie
M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE A. (*)	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONINGM. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
Mme SALABERT A.S.	Biophysique
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique

Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)

M. TOUBLET F-X.	Chimie Thérapeutique
-----------------	----------------------

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire C2VN (Centre CardioVasculaire et Nutrition, Marseille) dirigé par le Pr Marie-Christine Alessi que je remercie pour son accueil chaleureux.

Il a été encadré par le Dr Emmanuelle Reboul au sein de l'équipe 1 « Biodisponibilité des Micronutriments » que je remercie infiniment pour sa confiance et pour m'avoir chaleureusement accompagné dans ce travail avec beaucoup de disponibilité, d'humanité et d'expertise. Je remercie également infiniment le Pr Noël Peretti pour avoir accepté de superviser l'intégralité de ce travail et pour m'avoir permis de le mener à bien. Je tiens également à vous remercier de façon plus personnelle pour l'immense soutien et la patience dont vous avez fait preuve à mon égard. Je vous en serai éternellement reconnaissante.

Je remercie l'intégralité de l'équipe pédagogique de la Faculté de Pharmacie de Toulouse pour m'avoir transmis leur savoir.

Je remercie les Dr Elisa Boutet et Pierre Verhaeghe d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et de m'avoir prodigué leurs conseils. Je vous remercie également pour tout le travail et les efforts fournis à l'élaboration d'une filière « Recherche » au sein du cursus d'études pharmaceutiques de la Faculté de Pharmacie de Toulouse. Veuillez croire en mon plus profond respect. Je souhaite également remercier tout particulièrement le Professeur Jean-Edouard Gairin pour m'avoir accompagné et soutenu pendant mes années d'étude à la faculté de pharmacie de Toulouse et pour avoir accepté de conclure ces années en présidant ma soutenance de thèse.

Je remercie également les techniciennes du laboratoire C2VN Marion Nowicki et Charlotte Halimi pour leur expertise et pour m'avoir transmis les connaissances techniques nécessaires à l'accomplissement de ce travail.

Enfin, je remercie mon entourage, famille et amis, pour leur présence et leur bienveillance et surtout pour leur patience.

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

Enjeux de la supplémentation en vitamine E dans les hypocholestérolémies primaires intestinales et création d'un modèle d'étude

Les hypocholestérolémies primaires intestinales sont un groupe hétérogène de pathologies héréditaires liées à des mutations sur des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Ces mutations sont à l'origine d'un défaut d'assemblage et de sécrétion des lipoprotéines entraînant, dès la période néonatale, une malabsorption intestinale des lipides et des vitamines liposolubles (A, D, E, K). De ce fait, ces pathologies sont caractérisées par des taux de lipides plasmatiques extrêmement bas et des carences profondes en vitamines liposolubles. Or, la vitamine E est un micronutriment majeur impliqué dans le développement du système nerveux ; son absorption et son métabolisme dépendent de la sécrétion des chylomicrons. Ainsi, pour prévenir l'apparition de graves complications neurologiques et rétinienne en lien avec cette carence, une supplémentation orale en α -tocophérol à fortes doses doit être instaurée dès la petite enfance. Cependant, des études de suivi de ce traitement ont montré que, parmi les quatre vitamines liposolubles seuls les taux sériques en vitamine E restent chroniquement bas. Afin de comprendre l'échec de la supplémentation en vitamine E chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales, une première étude d'absorption de la vitamine E sur modèle de souris a été menée. Face à des résultats paradoxaux associant une faible concentration intestinale en vitamine E malgré une importante accumulation de triglycérides dans les tissus intestinaux, nous avons décidé de créer un modèle cellulaire d'hypocholestérolémies primaires afin d'explorer le métabolisme entérocytaire de la vitamine E. Ainsi, une invalidation des gènes impliqués dans ces pathologies a été effectuée sur cellules de carcinome de côlon humain (cellules Caco-2) grâce au système d'édition du génome CRISPR/Cas9. Après une mise en place du protocole d'invalidation et une caractérisation des modèles cellulaires, les premiers essais d'incubation de vitamine E sur cellules Caco-2 mutées ont montré l'existence d'une absorption de vitamine E inchangée associée à une sécrétion effondrée dans le compartiment basolatéral suggérant une dégradation de vitamine E au niveau cytoplasmique. Des études mécanistiques complémentaires sont actuellement en cours afin de comprendre cette dégradation accélérée intra entérocytaire et ainsi ouvrir possiblement de nouvelles perspectives thérapeutiques pour ces patients.

Mots clés : Vitamine E, α -tocophérol, chylomicron, hypocholestérolémie primaire, Maladie de rétention des chylomicrons, Abêtalipoprotéïnémie, CRISPR/Cas9, MTTP, Sar1b nutrition

Issues of vitamin E supplementation in patients with primary hypocholesterolemia and creation of a study model

Primary monogenic hypocholesterolemia represents a heterogeneous group of inherited disorders caused by mutations in genes involved in lipid metabolism. These mutations lead to a defective lipoproteins' assembly and secretion and to lipids and fat-soluble vitamins (A, D, E, K) malabsorption at an early age. As a result, these pathologies are characterized by extremely low plasma lipid levels and deep deficiencies in liposoluble vitamins. Because vitamin E is a major fat-soluble micronutrient involved in nervous system development, its absorption and secretion are normally dependent on chylomicrons. Thus, to prevent, long-term ophthalmological and neurological complications related to this deficiency, oral α -tocopherol supplementation with high dose must be introduced as early as possible during childhood. However, follow-up studies have shown that, among the four fat-soluble vitamins, only vitamin E plasma levels remain chronically low. In order to understand the failure of vitamin E supplementation in patients with primary monogenic hypocholesterolemia, previous studies were performed on a mouse model. Faced with paradoxical results associating a low intestinal concentration of vitamin E despite a significant accumulation of triglycerides in intestinal tissues, we decided to create a cellular model of primary hypocholesterolemia in order to explore vitamin E's metabolism. Thus, a genetic invalidation was performed on human colon carcinoma cells (Caco-2 cells) using the CRISPR / Cas9 genome editing system. After establishment of the protocol and a model characterization, vitamin E assays conducted on mutated Caco-2 cells. These assays showed an unchanged vitamin E absorption associated with a collapsed basolateral secretion, suggesting a cytoplasmic degradation of vitamin E. Further mechanistic studies are currently being carried out to understand this accelerated intra-enterocyte degradation and thus possibly open new therapeutic perspectives for these patients.

Keywords: Vitamin E, α -tocopherol, chylomicron, primary hypocholesterolemia, Chylomicron retention disease, Abetalipoproteinemia, CRISPR / Cas9, MTTP, Sar1b nutrition

SOMMAIRE

JURY	1
I. INTRODUCTION A LA VITAMINE E	15
A. HISTORIQUE.....	15
B. CHIMIE DE LA VITAMINE E.....	16
1. Structure chimique.....	16
2. Stéréochimie	21
3. Nomenclature	22
C. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES.....	23
D. SYNTHÈSE ET EXTRACTION DE LA VITAMINE E.....	23
1. Biosynthèse.....	24
2. Synthèse industrielle.....	25
II. VITAMINE E : BIODISPONIBILITÉ ET PHARMACOCINÉTIQUE	29
A. BIODISPONIBILITÉ.....	29
1. Besoins et apports en vitamine E.....	29
2. Sources alimentaires	30
3. Biodisponibilité	33
B. PHARMACOCINÉTIQUE.....	35
1. Digestion de la vitamine E	35
2. Métabolisme hépatique de la vitamine E.....	43
3. Distribution.....	47
4. Excrétion.....	48
5. Résumé sur le métabolisme de la vitamine E.....	49
III. VITAMINE E EN SANTÉ HUMAINE.....	51
A. ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE.....	51
B. MÉCANISMES D'ACTION DE L'ALPHA-TOCOPHÉROL AU NIVEAU CELLULAIRE.....	53
1. Régulations transcriptionnelles	54
2. Régulations post-transcriptionnelles	55
C. RÉGULATION DES FONCTIONS CELLULAIRES INTÉGRÉES	56
1. Inhibition de la prolifération cellulaire	56
2. Inhibition de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire	56
3. Inhibition de l'adhésion endothéliale des monocytes.....	57
D. LIENS ENTRE MÉCANISMES CELLULAIRES ET PATHOLOGIES.....	57
1. Athérosclérose et complications cardiovasculaires	57
2. Système immunitaire, allergie et inflammation.....	58

E.	VITAMINE E ET FONCTION NEUROLOGIQUE.....	59
1.	Vitamine E et maintien de l'intégrité du système nerveux	59
2.	Vitamine E et Alzheimer	61
IV.	LES HYPOCHOLESTEROLÉMIES PRIMAIRES INTESTINALES.....	63
A.	L'ABÉTALIPOPROTEINÉMIE (ABL).....	64
1.	Généralités.....	64
2.	Symptomatologie clinique.....	65
3.	Caractéristiques biologiques	67
B.	LA MALADIE DE RÉTENTION DES CHYLOMICRONS (CMRD).....	68
1.	Généralités.....	68
2.	Symptomatologie clinique.....	69
3.	Caractéristiques biologiques	70
C.	L'HYPOBÉTALIPOPROTÉINEMIE FAMILIALE.....	71
D.	PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE DES HYPOCHOLESTEROLÉMIES PRIMAIRES INTESTINALES.....	74
V.	ENJEUX DE CE TRAVAIL.....	77
VI.	CRÉATION DU MODÈLE D'ÉTUDE D'ABSORPTION DE LA VITAMINE E DANS LES HYPOCHOLESTEROLÉMIES PRIMAIRES INTESTINALES.....	79
A.	MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	79
	Matériel et produits	79
	Expérimentation animale	79
	Culture cellulaire	80
	Vérification des amorces génomiques	80
	Détermination de la confluence optimale pour la transfection.....	81
	Transfection cellulaire par le système «CRISPRMAX®».....	81
B.	RÉSULTATS.....	87
1.	Modèle de souris <i>Mttp</i> -iKO.....	87
2.	Modèle cellulaire Caco-2/TC7	94
C.	DISCUSSIONS ET CONCLUSION.....	105
1.	Discussion	105
2.	Conclusions et perspectives	107

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structures chimiques des quatre tocophérols	18
Figure 2. Structures chimiques des quatre tocotriénols	19
Figure 3. Structures chimiques de (1) l'acétate d' α -tocophérol, du (2) palmitate d' α -tocophérol et du (3) succinate d' α -tocophérol	20
Figure 4. Synthèse de l'isophytol	27
Figure 5. Dernière étape de la synthèse de l'(\pm)- α -tocophérol.....	27
Figure 6. Métabolisme intra-hépatique de la vitamine E.....	46
Figure 7. Absorption, transport et métabolisme de la vitamine E (d'après Schmölz L, et al.2016)	50
Figure 8. Mécanisme d'action de l' α -tocophérol dans la prévention de la propagation du processus de peroxydation lipidique	52
Figure 9. Taux de triglycérides, phospholipides, cholestérol et lipides totaux dans le tissu adipeux des souris WT et <i>Mttp</i> -iKo.....	88
Figure 10. Taux de triglycérides, phospholipides, cholestérol et lipides totaux dans le foie des souris WT et <i>Mttp</i> -iKo	89
Figure 11. Taux de triglycérides, phospholipides, cholestérol et lipides totaux dans le plasma des souris WT et <i>Mttp</i> -iKO.....	90
Figure 12. Taux de triglycérides, phospholipides, cholestérol et lipides totaux dans les différentes zones anatomiques de l'intestin des souris WT et <i>Mttp</i> -iKO.....	92
Figure 13. Concentrations de vitamines E dans le plasma, les érythrocytes, le foie, le tissu adipeux et dans les différentes zones anatomiques de l'intestin des souris WT et <i>Mttp</i> -iKO.....	94
Figure 14. Détermination de la confluence optimale pour la transfection.....	95
Figure 15. Détermination des ARN guide efficaces et spécifiques pour la transfection.....	96
Figure 16. Résultats du séquençage selon la méthode de Sanger de l'ADN génomique extrait des clones de cellules MTTP-KO et SAR1B-KO	98
Figure 17. Première analyse par Western-Blot des clones cellulaires mutés avec un anticorps primaire dirigé contre SAR1B ou MTTP.....	101
Figure 18. Clones mutés observés au microscope à contraste interférentiel (G: x760), après coloration au « Oil Red O ».	102
Figure 19. Absorption et sécrétion de vitamine E par les cellules TC7 sauvage (WT), MTTP-KO ou <i>Sar1b</i> -KO.....	103
Figure 20. Sécrétion de vitamine E par les cellules TC7 sauvage (WT), MTTP-KO ou <i>Sar1b</i> -KO.....	104
Figure 21. Accumulation de vitamine E par les cellules TC7 sauvage (WT), MTTP-KO ou <i>Sar1b</i> -KO.....	104

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Récapitulatif des groupements chimiques des quatre tocophérols	18
Tableau 2 Récapitulatif des groupements chimiques des quatre tocotriénols	19
Tableau 3. Isomères géométriques des tocotriénols	21
Tableau 4. Teneurs en α -tocophérols (mg/100g), en tocophérols et tocotriénols totaux (mg/100g), formes majoritaires et pouvoir vitaminique E de certaines huiles végétales et matières grasses.....	32
Tableau 5. Fréquence des symptômes cliniques et profil lipidique des patients ABL, FHBL et CMRD selon Peretti <i>et al.</i> , (2010) et Burnett <i>et al.</i> , (2012)	73
Tableau 6. Recommandations pour la supplémentation vitaminique orale des patients atteints d'hypocholestérolémies génétiques (d'après Levy <i>et al.</i> , 2015 et Peretti <i>et al.</i> , 2010).....	75
Tableau 7. Résumé des séquences des 4 clones de cellules analysés	99

ABREVIATIONS

ACAT: Acyl-CoA cholesterol acyltransferase

ANC : Apports nutritionnels conseillés

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ASAT : Aspartate aminotransférase ATP : Adénosine triphosphate

CEH : Carboxyle-ester hydrolase

CETP : Cholesteryl-ester transfert protein CHOL : Cholestérol

DAG : Diacylglycérol

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

ECG : Electro-cardiogramme

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EOC : Electro-oculogramme

ERES : Endoplasmic Reticulum Exit Sites

ERG : Electro-rétinogramme

FABP : Fatty acid binding protein

FAT: Fatty acid transporter

FATP : Fatty acid transport protein

FHBL : Hypobétalipoprotéinémie familiale

GDP : Guanosine diphosphate

gRNA : ARN guide

GTP : Guanosine triphosphate

HBL : Hypobétalipoprotéinémie

HDL : High-Density Lipoprotein

INR : International Normalized Ratio

LBP : Lipid binding protein

LDL : Low-Density Lipoprotein

LDLR : Low-Density Lipoprotein receptor

LP : Lipase pancréatique

LPL : Lipoprotéine lipase

MTP : Microsomal transfert triglyceride protein

NPC1L1 : Niemann-Pick C1 like 1

PC : Phosphatidylcholine

PCTV : Pre-Chylomicron Transport Vesicule

PDI : Protein disulfide isomerase

PKC : Protéine kinase C

PLTP : Phospholipide transfert protein

RE : Réticulum endoplasmique

SAR1B : Secretion Associated, Ras Related GTPase 1B

SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor accessory protein receptor

SRBI : Scavenger Receptor classe B type I

VLDL : Very-Low-Density Lipoprotein

α -TTP : α -tocopherol transfert protein

I. INTRODUCTION A LA VITAMINE E

A. HISTORIQUE

La découverte de la vitamine E fêtera ses 100 ans en 2022. Pourtant les questions concernant ses fonctions biologiques et son caractère essentiel pour la santé humaine restent encore nombreuses. Cette vitamine a été découverte à l'Université de Berkeley, lorsque l'embryologiste Herbert McLean Evans (1881–1971) et son assistante Katherine Scott Bishop (1889–1976) démontrèrent qu'en l'absence d'un composé liposoluble, aucun développement fœtal n'est observé chez des rates gestantes (1). Ce composé, initialement nommé Facteur X, semblait jouer un rôle essentiel dans la reproduction puisqu'en 1924, indépendamment des recherches de H. Evans et K. Bishop, Bennett Sure montre qu'un composé, lorsque retiré du régime alimentaire, induit chez les rats mâles des anomalies anatomiques et fonctionnelles de l'épithélium séminifère ainsi qu'une stérilité. Ce composé sera finalement nommé « tocophérol », du grec *tokos* : « progéniture » et *pherein* : « porter ». La vitamine E sera isolée pour la première fois, à partir de l'huile germe de blé, en 1936 et sa structure sera décrite en 1938 (2) (3). Paul Karrer reçut, la même année, le Prix Nobel de Chimie pour sa synthèse réussie de l'alpha-tocophérol racémique ((±)- α -tocophérol). Peu après, son puissant pouvoir antioxydant a été découvert et fut particulièrement étudiés par Henry A. Mattill (1883–1953) et Harold Saft Olcott (1909–1979) (4) mais ce n'est qu'en 1968 que le National Research Council des États-Unis définit la vitamine E comme composé nutritif indispensable à l'Homme. Depuis plusieurs dizaines d'années, le panel des rôles biologiques de la vitamine E s'élargit de plus en plus. Au-delà de ses puissantes propriétés antioxydantes, de nombreuses études ont montré l'implication directe de la vitamine E dans de nombreux mécanismes cellulaires tels que la régulation génique, la prolifération et l'adhésion cellulaire.

B. CHIMIE DE LA VITAMINE E

1. Structure chimique

Le terme « vitamine E » désigne une famille de molécules liposolubles regroupant les tocophérols (TOH) et les tocotriénols (T3), et possédant une activité biologique mesurée par un test appelé « *resorption gestation assay* ». Ce test permet de définir l'activité vitaminique de la vitamine E en mesurant sa capacité à prévenir la mort des embryons chez des rates gestantes carencées en vitamine E, par simple analyse du nombre de fœtus viables, mal formés ou morts après apport d'une forme spécifique de tocophérol ou de tocotriénol (5). Cette activité vitaminique ne doit pas être confondue avec l'activité antioxydante. En effet, cette dernière ne dépend que de la structure chimique de la molécule tandis que le pouvoir vitaminique dépend non seulement de la structure de la molécule mais également de sa capacité à se lier à certains récepteurs et, bien évidemment, de sa biodisponibilité dans l'organisme illustrée par des concentrations plasmatiques et tissulaires significativement plus faibles en γ -tocophérol qu'en α -tocophérol par exemple. Ainsi, bien que tous les stéréoisomères démontrent une activité antioxydante égale *in vitro*, seules les formes en configuration R en position 2 (voir ci-après) et plus particulièrement la forme α -tocophérol, permettent de couvrir les besoins en vitamine E chez l'homme.

La structure chimique de cette famille de molécules est composée d'un noyau 6-hydroxy-chromane (cycle chromanol) mono-, di- ou tri-méthylé d'où part une chaîne latérale isoprénique à 16 atomes de carbone, saturée chez les tocophérols (figure 1) et insaturée chez les tocotriénols (figure 2). La position et le nombre de groupements méthyles (sur les carbones 5, 7 et/ou 8) présents sur le cycle aromatique distingue les différents vitamères (α , β , γ , δ) (tableaux 1 et 2) tandis que la chaîne latérale détermine la lipophilie et la stéréochimie de la molécule. Les lettres grecques désignent le degré de méthylation du noyau, l' α -tocophérol étant le composé le plus méthylé. Ce dernier est la forme naturelle la plus active et sert donc de référence au sein de la famille de molécules. Ainsi, par rapport à cette référence, les β - et γ -tocophérols présentent une activité vitaminique réduite (respectivement 40 et 15 % de l'activité de la forme α) et le δ -tocophérol est pratiquement inactif. (6)

Pour des raisons d'uniformisation, on exprime les taux de vitamine E dans un aliment en équivalent α -tocophérol (α -TE ou α -Teq). Ainsi, la teneur en vitamine E des aliments basée uniquement sur les taux d' α -tocophérol est inférieure ou égale à celle calculée en équivalents α -tocophérol, car les α -TE pondèrent également la contribution des autres tocophérols et des tocotriénols. Cet équivalent se calcule en déterminant dans un premier temps la quantité en mg/100g (m/m) de chaque tocophérol et chaque tocotriénol et en appliquant la formule suivante :

$$\alpha\text{-tocophérol} + \text{tocophérols } (0.4\beta + 0.1\gamma + 0.01\delta) + \text{tocotriénols } (0.3\alpha + 0.05\beta + 0.01\gamma)$$

Ce calcul suggère que chaque molécule ne contribue pas de façon équivalente à l'activité vitaminique E. En effet, 1 mg d'équivalents α -tocophérol (α -TE) correspond à 1 mg d' α -tocophérol, 2 mg de β -tocophérol, 10 mg de γ -tocophérol et 3,3 mg d' α -tocotriénol.

Ainsi, depuis 1982 l'utilisation du terme « vitamine E » désigne l'ensemble des dérivés tocophérols et tocotriénols démontrant une activité biologique que l'on peut exprimer par rapport à l' α -tocophérol, activité retrouvée dans les 8 molécules précédemment citées (*International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry and Molecular Biology Joint Commission on Biochemical Nomenclature*, 1982). (7)

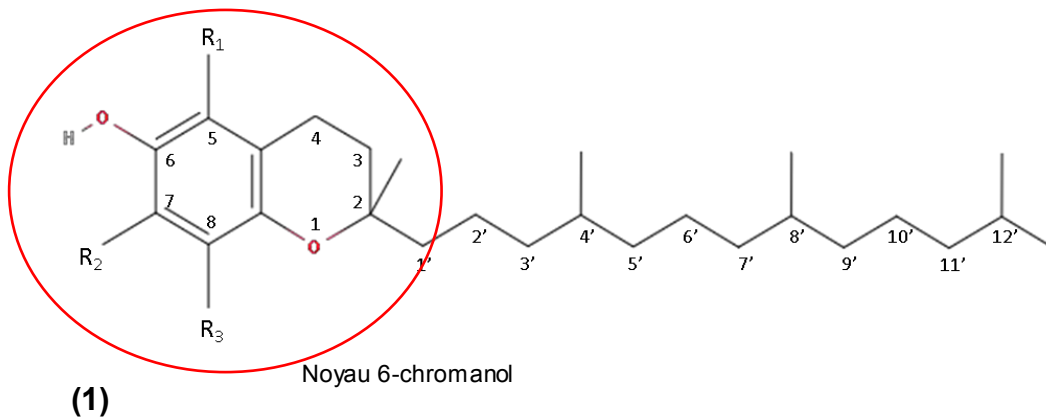


Figure 1. Structures chimiques des quatre tocophérols

$R_1 = R_2 = R_3 = H$	Tocol
$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$	α -tocophérol
$R_1 = R_2 = CH_3 ; R_3 = H$	β -tocophérol
$R_1 = H ; R_2 = R_3 = CH_3$	γ -tocophérol
$R_1 = R_2 = H ; R_3 = CH_3$	δ -tocophérol

Tableau 1. Récapitulatif des groupements chimiques des quatre tocophérols

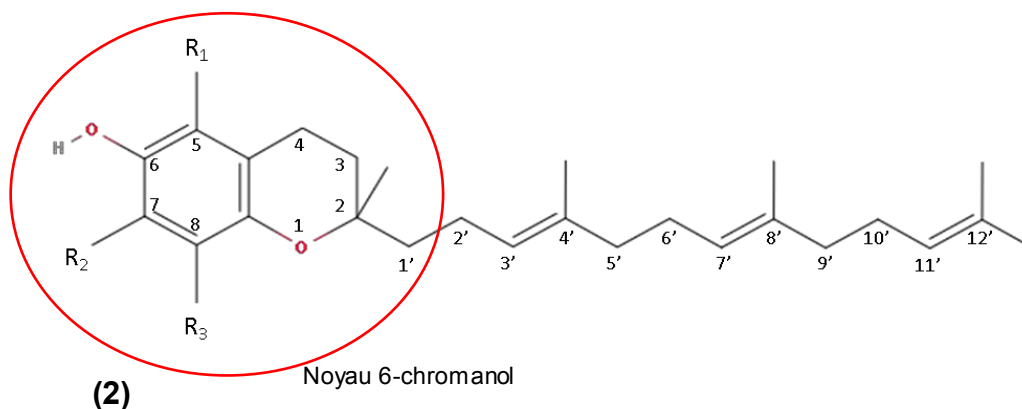
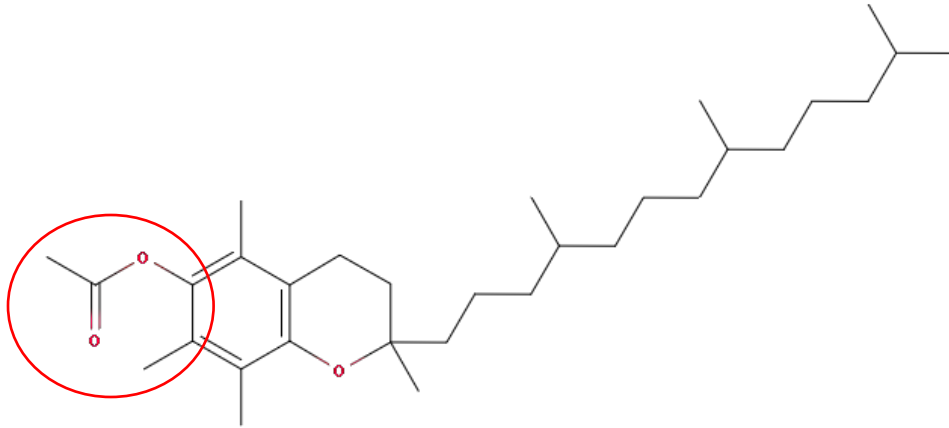


Figure 2. Structures chimiques des quatre tocotriénols

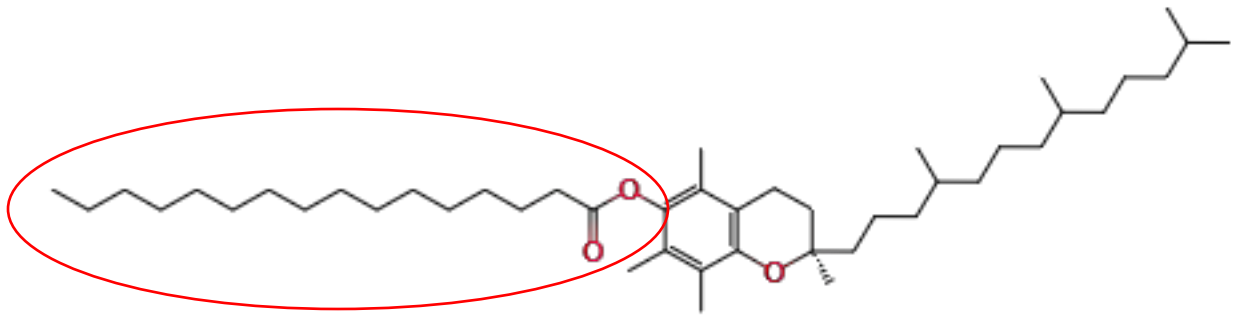
$R_1 = R_2 = R_3 = H$	Tocotriénol
$R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$	α -tocotriénol
$R_1 = R_2 = CH_3 ; R_3 = H$	β -tocotriénol
$R_1 = H ; R_2 = R_3 = CH_3$	γ -tocotriénol
$R_1 = R_2 = H ; R_3 = CH_3$	δ -tocotriénol

Tableau 2 Récapitulatif des groupements chimiques des quatre tocotriénols

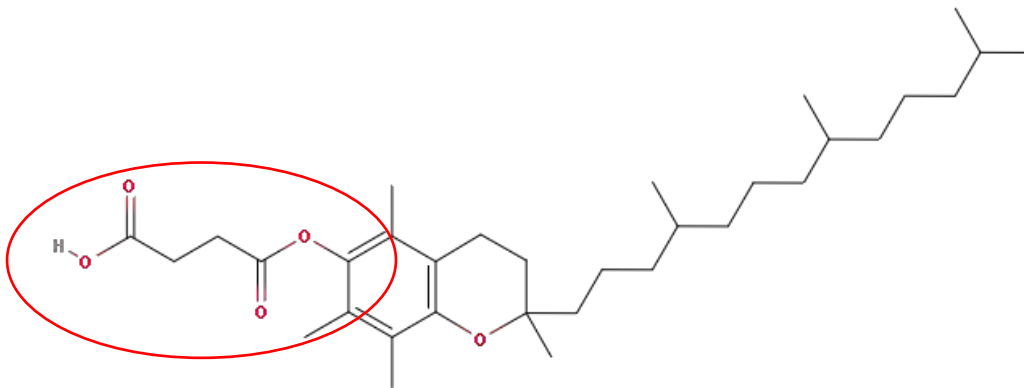
Concernant la structure chimique, il faut également noter que chacune des 8 molécules de la famille de la vitamine E peut être estérifiée sur le groupement hydroxyle en position 6 du cycle chromanol par un groupement acétate (acétate de tocophérol), succinate (succinate de tocophérol), nicotinate ou phosphate. Ces formes estérifiées ont l'avantage d'être plus stables et moins sensibles à l'oxydation (Figure 3). (8) (9) La vitamine E existe également sous forme synthétique : il s'agit du (\pm)- α -tocophérol, c'est-à-dire la forme racémique de l' α -tocophérol, dont la forme acétate est utilisée pour la supplémentation en vitamine E en santé humaine.



(1)



(2)



(3)

Figure 3. Structures chimiques de (1) l'acétate d' α -tocophérol, du (2) palmitate d' α -tocophérol et du (3) succinate d' α -tocophérol

2. Stéréochimie

En analysant la structure des tocophérols, on peut noter la présence de trois carbones asymétriques (centres chiraux) à la position 2 du cycle chromanol et aux positions 4' et 8' de la chaîne latérale. Chaque tocophérol possède donc huit (2^3) isomères optiques. L' α -tocophérol, par exemple, peut exister sous forme RRR, RSR, RRS, RSS, SRR, SSR, SRS et SSS, mais seul le (2R, 4R, 8'R)- α -tocophérol est retrouvée dans les organismes vivants, probablement en raison d'une stéréospécificité des enzymes impliquées dans sa biosynthèse. Pour cette raison, la vitamine E naturelle est souvent notée (+)- α -tocophérol ou RRR- α -tocophérol (10). Il en est de même pour les autres molécules, il existe donc 32 stéréoisomères dans la famille des tocophérols mais seules les formes 2R (RRR, RSR, RRS et RSS) sont considérés comme des formes actives de vitamine E. (11) (12)

Les tocotriénols dérivés du 2-méthyl-2-(4', 8', 12'-triméthyltridéca-3', 7', 11'-triényl) chroman-6-ol (structure cyclique non méthylée) possèdent seulement un centre chiral sur le carbone 2. Par conséquent, seuls les stéréoisomères 2R et 2S existent. Cependant, les insaturations en position 3' et 7' du groupement phytyle permettent de décrire quatre isomères géométriques *cis* et *trans* décrit dans le tableau 3. Seuls les isomères 2R, 3'-*trans* et 7'-*trans* existent dans la nature.

<i>Configuration R en position 2</i>	<i>Configuration S en position 2</i>
2R, 3' <i>cis</i> , 7' <i>cis</i>	2S, 3' <i>cis</i> , 7' <i>cis</i>
2R, 3' <i>cis</i> , 7' <i>trans</i>	2S, 3' <i>cis</i> , 7' <i>trans</i>
2R, 3' <i>trans</i> , 7' <i>cis</i>	2S, 3' <i>trans</i> , 7' <i>cis</i>
2R, 3' <i>trans</i>, 7' <i>trans</i>	2S, 3' <i>trans</i>, 7' <i>trans</i>

Tableau 3. *Isomères géométriques des tocotriénols*

3. Nomenclature

Du fait de la complexité de cette famille de molécules, il est essentiel d'en comprendre la nomenclature établie en 1981 par le Comité de la Commission de la Nomenclature Biochimique lors des recommandations IUPAC-IUB (13). En effet, cette nomenclature définit officiellement les termes présentés ci-dessous.

- Vitamine E : Ce terme désigne tous les dérivés de tocol et de tocotriénol présentant qualitativement, entièrement ou en partie, la même activité biologique que l' α -tocophérol.
- Tocol : Ce terme désigne le 2-méthyl-2-(4', 8', 12'-triméthyltridécyl) chroman-6-ol où $R_1 = R_2 = R_3 = H$.
- Tocophérols : Ce terme doit être utilisé comme nom générique pour désigner tous les mono-, di- et tri-méthyle hydroxy-chromane à chaîne latérale saturée. Il n'est pas synonyme de « vitamine E ». L' α -tocophérol désigne le *5,7,8-trimethyl tocol* ($R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$) dont le seul stéréoisomère naturel est le 2R, 4'R, 8'R, le β -tocophérol désigne le *5,8-dimethyl tocol* ($R_1 = R_3 = CH_3$; $R_2 = H$), le γ -tocophérol désigne le *7,8-dimethyl tocol* ($R_1 = H$; $R_2 = R_3 = CH_3$), le δ -tocophérol désigne le *8-methyl tocol* ($R_1 = R_2 = H$; $R_3 = CH_3$).
- Tocotriénols : Ce terme est utilisé pour désigner tous les mono-, di- et tri-méthyle hydroxy-chromane à chaîne latérale insaturée (seuls les trans-E (E, E) -tocotriénols ont été trouvés dans la nature) mais désigne aussi le 2-méthyl-2-(4',8',12'-triméthyltridéca-3',7',11'-trienyl) chroman-6-ol ». L' α -tocotriénol (ou 3-tocochromanol) désigne le *5,7,8-trimethyltocotriénol* ($R_1 = H$; $R_2 = R_3 = CH_3$), le β -tocophérol désigne le *5,8-dimethyltocotriénol* ($R_1 = R_3 = CH_3$; $R_2 = H$), le γ -tocophérol désigne le *7,8-dimethyltocotriénol* ($R_1 = H$; $R_2 = R_3 = CH_3$), le δ -tocophérol désigne le *8-methyltocotriénol* ($R_1 = R_2 = H$; $R_3 = CH_3$).

C. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Tous les tocophérols se présentent, à température ambiante, sous forme d'huile visqueuse, limpide, légèrement jaune à ambre et peu odorante. Ils peuvent aussi se présenter sous forme de poudre cristalline blanche. Ce sont des composés fortement lipophiles ($\log K_{ow} = 12.2$) et sont donc insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques (éthers, acétone, chloroforme, méthanol, alcools méthyliques et éthyliques). Ils sont stables à la chaleur en absence d'oxygène, et ne sont pas dégradés par la lumière visible. A l'inverse, ils s'oxydent rapidement lors d'une exposition prolongée à l'oxygène de l'air ou à la lumière ultra-violette. Les esters de tocophérols et notamment l'acétate d' α -tocophérol sont sensiblement plus stables. (14).

D. SYNTHÈSE ET EXTRACTION DE LA VITAMINE E

Le marché de la vitamine E, à l'échelle industrielle, est en pleine expansion du fait de son utilisation croissante dans l'alimentation animale, dans l'agro-alimentaire, dans l'industrie pharmaceutique (compléments alimentaires, ADDFMS, nutrition infantile et médicaments) et dans l'industrie cosmétique. En effet, la vitamine E constitue l'un des principaux micronutriments utilisés dans l'industrie de l'alimentation du bétail puisqu'elle permet d'améliorer la productivité des élevages (amélioration de la fonction immunitaire, de la santé et du rendement de reproduction du bétail) mais aussi d'améliorer la qualité de la viande (valeurs nutritionnelles et durée de conservation). De plus, les marchés des compléments alimentaires et des cosmétiques à base de vitamine E sont en forte croissance (+4% et +7% respectivement) du fait de ses propriétés antioxydantes (Rapport Global Market Insight : *Vitamin E market outlook: Cosmetics & Dietary applications to offer dynamic growth opportunities over 2016-2024*). La vitamine E vendue dans le commerce est obtenue soit par synthèse chimique, soit par extraction. La vitamine E naturelle provient majoritairement de l'huile de soja d'où elle est extraite pendant les étapes de raffinage et de désodorisation de l'huile, mais en raison des limites de production du soja et de son coût final non négligeable ($> 20 \text{ \$ / kg}$), elle est principalement destinée aux

applications humaines. Les besoins en vitamine E destinée au marché du bétail sont, quant à eux, couverts par l'acétate de tocophérol synthétique (15).

1. Biosynthèse

Tous les noyaux 6-hydroxy-chromanols constituant la famille de la vitamine E sont retrouvés dans les plantes supérieures, les algues, dans certaines plantes non photosynthétiques, mais aussi dans les levures et les champignons. En effet, tous les organismes photosynthétiques (à l'exception des bactéries photosynthétiques et de l'algue bleu-vert *Anacystis nidulans*) peuvent synthétiser cette vitamine, faisant des plantes la principale source alimentaire naturelle. La vitamine E est synthétisée par les chloroplastes dans les tissus photosynthétiques (où l' α -tocophérol est la forme prédominante), mais aussi dans mitochondries des tissus non photosynthétiques (où le γ -tocophérol est la forme prédominante) (16) (17). Deux voies de synthèse ont été décrites : la voie des tocophérols et la voie des tocotriénols.

a) Voie des tocophérols

Cette voie fait intervenir l'homogentisate prenyltransferase (HST) qui condense une molécule de phytyl-pyrophosphate (phytyl-PP) sur le carbone 6 de l'acide homogentisique, simultanément à une réaction de décarboxylation, pour donner le 2-méthyl-6-phytylplastoquinone, le premier véritable intermédiaire précurseur de tous les tocophérols. Une méthylation en position 3 permet la synthèse du 2,3-diméthyle-6-phytyl-plastoquinol, qui subira une étape de cyclisation pour former le γ -tocophérol. Une seconde méthylation en position 5 donne le RRR- α -tocophérol. La synthèse du δ - et du β -tocophérol n'a pas encore été clairement élucidée mais il est vraisemblable qu'elle se produise à partir du 2-méthyl-6-phytylplastoquinol (18).

b) Voie des tocotriénols

Dans cette voie non enzymatique, l'acide homogentisique réagit avec une molécule de géranyl-géranyl pyrophosphate pour donner le 6-géranyl-géranyl-toluquinol, qui donnera par la suite le δ -tocotriénol. Des méthylation supplémentaires permettront d'obtenir le β -tocotriénol, le γ -tocotriénol et l' α -tocotriénol. La chaîne latérale peut ensuite être saturée pour former le RRR- α -tocophérol. (19)

2. Synthèse industrielle

Du fait de son importance en santé humaine mais aussi en santé animale, la vitamine E représente un enjeu thérapeutique et économique majeur. C'est pourquoi la maîtrise de sa synthèse a valu, à Paul Karrer, le Prix Nobel de Chimie en 1938.

L' α -tocophérol d'origine synthétique se distingue de l' α -tocophérol naturel par deux propriétés : l'activité biologique et l'activité optique. En effet, bien que faisable, la voie de synthèse industrielle de l' α -tocophérol ne permet pas d'obtenir un seul isomère optique mais un mélange racémique. Ainsi, à quantité égale l'activité biologique de la forme synthétique ((\pm)- α -tocophérol) correspond à seulement la moitié de la forme naturelle (RRR- α -tocophérol) (20).

La synthèse se fait en trois étapes : la fabrication du cycle aromatique (2,3,6-triméthylhydroquinone), la production d'isophytol racémique servant à la constitution de la chaîne latérale, suivi d'une réaction de condensation de ces deux molécules.

- La fabrication de la 2,3,6-triméthylhydroquinone se fait par méthylation catalytique du m-crésol en triméthylphénol qui sera oxydé en quinone puis réduit en hydroquinone. L'obtention du monoacétate de triméthylhydroquinone permet d'obtenir directement un mélange racémique d'acétate de tocophérol par une réaction de condensation avec le (\pm)-isophytol. (21)
- La formation de l'isophytol (alcool terpénique) est une étape essentielle à la synthèse finale. On en produit environ 50 000 tonnes/an, d'une part pour la synthèse de la vitamine E et de la vitamine K et d'autre part pour la synthèse de parfums et d'arômes. La réaction débute par la condensation de l'acétone (C_3H_6O) avec l'acétylène (C_2H_2), par action d'une base forte, suivi d'une réduction partielle (hydrogénation) de l'alcyne intermédiaire catalysée par le

Palladium de Lindlar. On obtient alors le 3-méthyl-1-buten-3-ol ($C_5H_{10}O$) qui sera condensé avec l'isopropénylméthyl éther ($C_4H_{10}O$) pour former la 2-méthylhepténone ($C_8H_{14}O$), chaîne à 8 carbones. A partir de composé, l'allongement de la chaîne carbonée se fait par ajouts successifs d'acétylène et d'isopropénylméthyl éther suivi d'une hydrogénation au Palladium de Lindlar afin d'obtenir le (\pm)-isophyto1 (figure 4) (21).

- La condensation de l'isophyto1 avec la 2,3,6-triméthylhydroquinone (figure 5) a abouti à la première production de vitamine E chez F. Hoffmann – La Roche à Bâle au début des années 1950. Il s'agit d'une réaction simple en présence d'un acide de Lewis (le trichlorure d'aluminium $AlCl_3$ par exemple) qui permet d'obtenir directement le (\pm)- α -tocophérol. (21)

Toutefois, l' α -tocophérol est très souvent acétylée afin d'obtenir une forme d'acétate qui présente l'avantage d'être plus stable dans le temps, ce qui rend sa commercialisation dans les compléments alimentaires plus aisée. L'activité vitaminique de cette forme estérifiée est sensiblement la même que la forme hydroxylée. Afin de réaliser cette ultime étape de la synthèse, on estérifie l'(\pm)- α -tocophérol à l'aide d'anhydride éthanoïque.

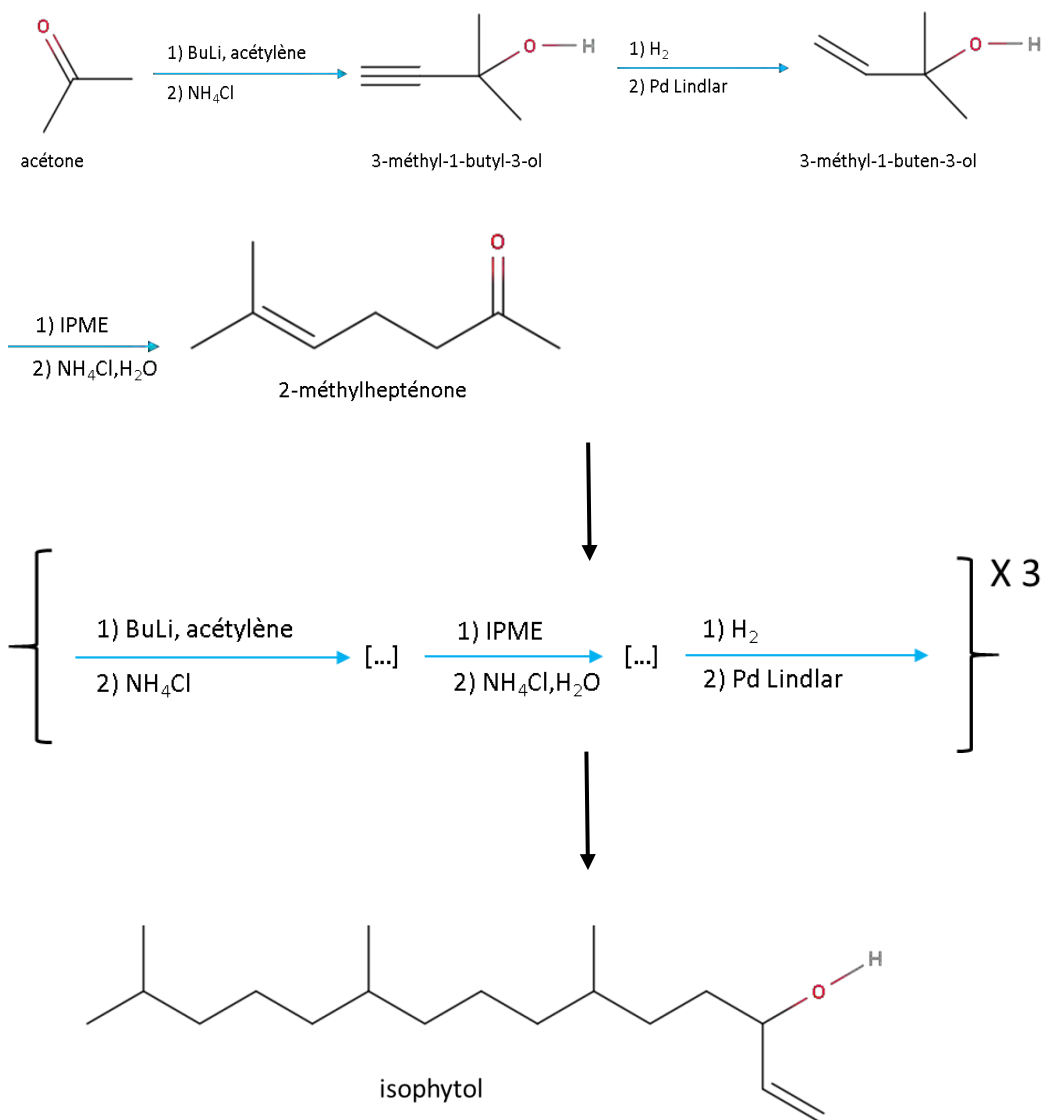


Figure 4. Synthèse de l'isophytol

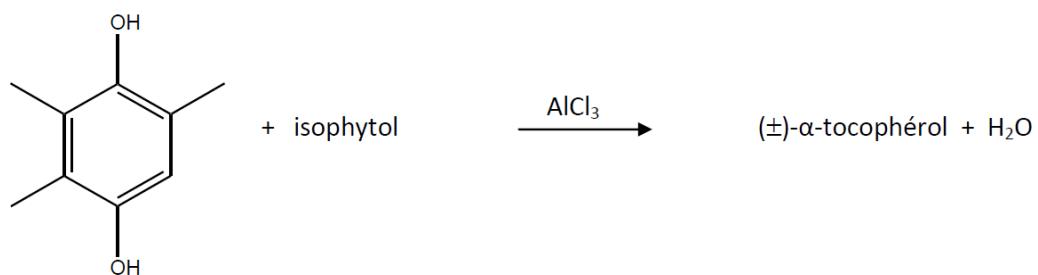


Figure 5. Dernière étape de la synthèse de l'(±)-α-tocophérol

II. VITAMINE E : BIODISPONIBILITÉ ET PHARMACOCINÉTIQUE

A. BIODISPONIBILITÉ

La biodisponibilité de la vitamine E dépend de différents facteurs tels que les apports en vitamine E et la composition du bol alimentaire, les protéines impliquées dans son absorption et son métabolisme, le mode de vie, l'âge, le sexe et les polymorphismes génétiques de l'individu.

1. Besoins et apports en vitamine E

Les apports quotidiens conseillés en vitamine E sont révisés régulièrement. Ainsi, le dernier rapport de l'EFSA (*European Food Safety Authority*) datant de 2015 établit que les apports adéquats sous forme d' α -tocophérol s'élèvent à 13 mg par jour pour les Hommes et à 11 mg par jour pour les femmes. Pour les nourrissons et les enfants, les apports adéquats sont compris entre 5 et 13 mg par jour (22). Cette nouvelle recommandation remplace la valeur unique de 12 mg d' α -tocophérol par jour déterminée grâce à des études menées sur l'Homme entre les années 1950 et 1960 dans lesquelles avaient été estimés les taux sanguins de vitamine E nécessaires pour inhiber le phénomène d'hémolyse induite par la peroxydation lipidique se produisant chez des patients carencés ; un apport de 12 mg d' α -tocophérol par jour était suffisant pour atteindre une concentration sérique de 12 $\mu\text{mol/L}$ d' α -tocophérol, seuil minimal à partir duquel un effet positif avait été observé. Sur la base de ces résultats, cette valeur est devenue la valeur de la concentration physiologique optimale et a permis de définir la carence comme étant une concentration sérique en α -tocophérol inférieure à 12 $\mu\text{mol/L}$ (11). Bien que révisées récemment, ces recommandations, ne prennent toujours pas en compte les facteurs influençant les besoins spécifiques en vitamine E tels que le vieillissement ou la quantité de masse grasse de l'individu et aucune mention n'est faite sur la nécessité de privilégier l' α -tocophérol par rapport aux autres vitamères.

D'ailleurs, l'apport en vitamine E dans la population générale est trop faible quelle que soit la région du monde considérée. En effet, selon une méta-analyse datant de 2015, les

apports en tocophérols (toutes formes confondues) étaient inférieurs à l'apport journalier recommandé pour la majeure partie de la population, voire inférieurs au seuil minimal de 12 mg par jour, tant dans les pays en développement que dans les pays industrialisés. Pour exemple, aux Etats-Unis, l'apport médian était de 6,2 mg par jour pour l' α -tocophérol et de seulement 1 mg par jour pour le γ -tocophérol (23). Une autre étude a récemment montré que plus de 2/3 des adultes sud-coréens présentent des concentrations sériques en vitamine E proches du seuil minimal (12 à 30 $\mu\text{mol/L}$; le seuil optimal étant fixé à 30 $\mu\text{mol/L}$) et près du quart des adultes sont carencés ($< 12 \mu\text{mol/L}$) (24). De même, dans les zones rurales du Népal et du Bangladesh, environ un tiers des femmes enceintes sont gravement carencées en vitamine E ($< 10 \mu\text{mol/L}$). L'apport en vitamine E est également trop faible dans de nombreux pays industrialisés comme le Royaume-Uni, l'Allemagne et les Pays-Bas (25)109.

Pourtant, malgré un apport insuffisant, la carence en vitamine E est quasiment inexistante en conditions physiologiques du fait du stockage préférentiel de la vitamine E dans le tissu adipeux (environ 90% de la teneur totale en vitamine E du corps) (26) à partir duquel elle est constamment mobilisée. C'est pourquoi les symptômes liés à une alimentation largement déficitaire en vitamine E ne sont généralement visibles qu'après plusieurs décennies de malnutrition.

2. Sources alimentaires

Comme évoqué précédemment, la vitamine E est retrouvée essentiellement dans les végétaux. Ainsi, on la retrouve majoritairement dans les céréales (seigle, blé, avoine...), dans les fruits, et dans la plupart des oléagineux, dont leurs huiles (tournesol, soja, maïs, olive, arachide...). Les concentrations en vitamine E sont très variables allant de concentrations extrêmement faibles dans les légumes (moins de 0.5 mg α -TE/100g) à des niveaux très élevés dans les graines de plantes oléagineuses (environ 170 mg α -TE/100g dans l'huile de germe de blé) (27). Une quantité restreinte de vitamine E est retrouvée dans les produits d'origine animale (muscles et organes). D'un point de vue nutritionnel, la forme la plus importante de vitamine E est l' α -tocophérol ; cela est corroboré par des essais de bioconcentration sur modèles animaux, qui évaluent la capacité des différents vitamères à prévenir une abortion fœtale et des dystrophies musculaires. De plus, il a été montré en 1996, grâce à des expériences de réalimentation d'animaux carencés, que le γ -

tocophérol est bien moins capté que l' α -tocophérol par l'ensemble des organes (28). En conséquence, les sources alimentaires contenant préférentiellement de l' α -tocophérol (comme l'huile de germe de blé) doivent être favorisées. De même, d'un point de vue pharmacologique, les antioxydants sont de plus en plus prescrits pour prévenir et ralentir certains aspects du vieillissement (y compris cérébral) et lutter contre les effets de l'ischémie (générée par les radicaux libres). Or, ces résultats montrent qu'il est peu efficace de proposer l'utilisation d'autres vitamines que l' α -tocophérol. En France, 60 à 75% des apports en vitamine E proviennent exclusivement des huiles végétales. Or, certaines huiles contiennent plus de 50% de vitamine E sous forme de γ -tocophérol. Il a d'ailleurs été montré qu'aux États-Unis la ration alimentaire apporte deux à quatre fois plus de γ -tocophérol que d' α -tocophérol (29), en raison d'une consommation importante d'huiles végétales de maïs, de soja ou de sésame (30).

Les teneurs en α -tocophérol (mg/100g), en tocophérols et tocotriénols totaux (mg/100g), ainsi que les formes majoritaires et le pouvoir vitaminique E de certaines huiles végétales et matières grasses sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 4). Ce tableau permet de mettre en évidence l'importance de la teneur en α -tocophérol dans le pouvoir vitaminique E d'une huile. Pour exemple, bien que l'huile de ricin soit riche en tocophérols et tocotriénols (81,99 mg/100g), son équivalent α -tocophérol est faible (6,20) du fait de la faible quantité d' α -tocophérol comparativement aux autres formes de tocophérols.

Huile/corps gras	α -toto-phérol (mg/100g)	Tocophérols + tocotriénols totaux (mg/100g)	Formes majoritaires (par ordre décroissant)	α -Teq
<i>Huile de ricin</i>	0,90	81,99	$\gamma > \delta > \beta > \alpha$	6,20
<i>Huile de noix de coco</i>	1,82	3,88	$\alpha > \delta > \gamma > \beta$	2,25
<i>Huile de maïs</i>	25,69	108,65	$\gamma > \alpha > \delta > \beta$	34,09
<i>Huile de lin</i>	0,54	58,62	$\gamma > \delta > \alpha > \beta$	6,28
<i>Huile d'olive</i>	11,91	13,25	$\alpha > \gamma$	12,04
<i>Huile de palme</i>	6,05	27,24	Tocotriénols > α	7,91
<i>Huile d'arachide</i>	8,86	13,59	$\alpha > \gamma > \delta > \beta$	9,37
<i>Huile de pépins de raisin</i>	18,88	68,67	$\gamma > \alpha > \delta$	23,75
<i>Huile de carthame</i>	44,92	49,33	$\alpha > \gamma > \beta > \delta$	45,54
<i>Huile de soja</i>	9,53	104,57	$\gamma > \delta > \alpha > \beta$	17,28
<i>Huile de tournesol</i>	62,20	67,13	$\alpha > \gamma > \beta$	63,37
<i>Huile de germe de blé</i>	150,75	240,14	$\alpha > \gamma > \beta$	169,60
<i>Huile de foie de morue</i>	20,26	20,26	α	20,26
<i>Margarine</i>	7,56	28,98	$\alpha > \gamma > \delta$	9,47
<i>Beurre</i>	2,00	2,00	α	2,00

Tableau 4. Teneurs en α -tocophérols (mg/100g), en tocophérols et tocotriénols totaux (mg/100g), formes majoritaires et pouvoir vitaminique E de certaines huiles végétales et matières grasses

(Selon « Vitamin E : Food Chemistry, Composition, and Analysis » Livre de Ronald R. Eitenmiller, Lee, J. (2004), Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.1201/9780203970140> et "Tocopherols and Tocotrienols in Finnish Foods: Oils and Fats" E.-L. Syv~ioja, V. Piironenb, P. Varo , P. Koivistoinenb and K. Salminena avalio Finnish Cooperative Dairies' Association, Helsinki, Finland, and Department of Food Chemistry and Technology, University of Helsinki, Helsinki, Finland)

Il est important de noter qu'au sens du règlement (CE) 1924/2006 et de la directive 90/496/CE, toutes les huiles végétales peuvent s'afficher « source de vitamine E » puisqu'elles contiennent au moins 1,8 mg/100g (soit 15 % de l'AJR) et la plupart sont « riches en vitamine E » (puisqu'elles contiennent 30 % de l'AJR pour 100 g). Ainsi, une alimentation équilibrée peut apporter jusqu'à 18 mg de vitamine E par jour.

D'un point de vue réglementaire, les questions de toxicité et de sécurité doivent être considérées, car la supplémentation en vitamine E est largement répandue, que ce soit en automédication ou sur ordonnance médicale. Les études de reprotoxicité chez l'animal ont été concluantes et une activité antimutagène a été observée que ce soit avec les dérivés naturels ou synthétiques de vitamine (31). La limite de consommation a été fixée à 300mg/24h par le SCF (*Scientific Committee on Food*) au niveau européen, valeur rappelée le 12 octobre 2004 par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (remplacé par l'Agence Nationale chargée de la Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail ou ANSES depuis 2010) dans la saisine n° 2004-SA-0210.

3. Biodisponibilité

Les concentrations sanguines en nutriments, y compris la vitamine E, sont généralement influencés par des facteurs tels que le sexe, l'âge et le mode de vie (obésité, tabagisme, consommation d'alcool) (32). Concernant l'influence de l'âge, Campbell et *al.* ont montré que les concentrations sériques en vitamine E diminuaient après 80 ans, probablement en raison d'une réduction globale des apports alimentaires chez les personnes âgées (33). Cependant, cette diminution ne semble pas affecter les stocks hépatiques (34). Dans d'autres études, une augmentation des concentrations sériques en vitamine E chez les personnes âgées de 60 ans a été expliquée par l'augmentations des taux de cholestérol et de lipoprotéines (35) ainsi que par les modifications notables du mode de vie.

Concernant les autres facteurs de variabilité, de nombreux essais cliniques ont montré l'existence d'une relation inverse entre l'obésité chez l'homme et la concentration sérique en α -tocophérol (36)(37). Cependant, lorsque l'on tient compte des données d'obésité chez la femme, aucune corrélation claire et définitive entre concentration en vitamine E et obésité (définie par l'indice de masse corporelle ou par le pourcentage de masse grasse) n'a été montrée (38). Pourtant, d'autres paramètres définissant l'obésité tels que le tour de

taille et le rapport taille/hanches, semblent être effectivement corrélés négativement aux taux sériques en vitamine E, quel que soit le sexe. En effet, Wallström et *al.* a montré que des taux bas d' α -tocophérol étaient associés à une augmentation de l'adiposité centrale après ajustement des résultats en fonction de la répartition la masse grasse. De même, un lien a été fait entre IMC et concentration sérique en γ -tocophérol (39).

Pour ce qui est du tabac, il semble cohérent d'envisager que le fait de fumer affecte les taux sériques d'antioxydants, tels que la vitamine E. Cette hypothèse a été confirmée par des études d'observation qui ont montré que les fumeurs présentaient des concentrations sériques d' α -tocophérol inférieures à celle des non-fumeurs (40). Cependant, il a été suggéré que le seul fait de fumer n'était pas nécessairement responsable de ces différences, car des études contredisent ces conclusions et les différences d'habitudes alimentaires des fumeurs n'ont pas toujours été prises en compte (41). Des études ont donc tenté de faire un lien entre vitamine E et cigarette en dosant, non pas les concentrations plasmatiques, mais les teneurs en vitamine E au sein même du tissu artériel. Mezzetti et *al.* a conclu que ces teneurs étaient significativement plus basses dans le groupe des fumeurs par rapport au groupe des non-fumeurs. Cette observation peut laisser penser que la vitamine E, agissant comme puissant antioxydant, est consommée au sein même de la paroi artérielle pour prévenir son altération par oxydation (42).

La consommation chronique d'alcool est également un facteur corrélé à une diminution des concentrations sériques en vitamine E, en partie à cause de la malnutrition souvent retrouvée dans cette catégorie de la population. Cette observation a également été faite chez le rat, chez qui, l'administration chronique d'alcool entraîne une diminution significative d' α -tocophérol au niveau hépatique (43).

Finalement, les polymorphismes génétiques au niveau des gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme de la vitamine E pourraient également expliquer les différences interindividuelles de biodisponibilité. En effet, plus de 50 polymorphismes nucléotidiques (SNP) ont été associés à l'homéostasie de la vitamine E (44) (45) (46) (47)

B. PHARMACOCINÉTIQUE

L'alimentation permet l'apport de nutriments indispensables à la vie. Or, pour assurer les besoins métaboliques et énergétiques de l'organisme, ces derniers doivent être absorbés efficacement à travers la muqueuse intestinale afin de rejoindre la circulation générale. A l'instar des autres nutriments essentiels, il est donc indispensable de comprendre les mécanismes régissant la pharmacocinétique de la vitamine E, à savoir son absorption, sa distribution aux tissus, son métabolisme et finalement son excrétion.

1. Digestion de la vitamine E

La vitamine E, en tant que vitamine liposoluble, suit les processus d'absorption intestinale, de métabolisme hépatique et de transport vasculaire des lipides alimentaires (45). Par conséquent, la présence d'aliments riches en lipides favorise l'absorption intestinale de la vitamine E.

La digestion des lipides et de la vitamine E, est un processus complexe qui se déroule en trois étapes bien distinctes : (i) une première étape d'hydrolyse, d'émulsification et de mise en solution micellaire par les lipases salivaires, gastriques et pancréatiques, (ii) une étape d'absorption par les entérocytes des produits d'hydrolyse sous forme de micelles formées à partir des acides biliaires, et (iii) une dernière étape de synthèse des lipoprotéines au sein des cellules intestinales pour permettre l'exocytose des lipides dans les systèmes lymphatique puis sanguin. Il ne semble pas exister de mécanismes de sélection entre les différentes formes de vitamine E au cours de l'ensemble de ces étapes. Aucun métabolisme de la vitamine E ne semble exister dans l'estomac (48).

Afin de comprendre l'absorption intestinale de la vitamine E, ces étapes vont être détaillées.

a) Hydrolyse des lipides complexes

Le processus de digestion commence dans la partie supérieure du tractus digestif où la vitamine E et les lipides alimentaires sont extraits de la matrice alimentaire, sous l'action des mouvements péristaltiques de l'estomac, puis dissous au sein de la phase lipidique du repas, pour être finalement incorporés et assemblés en micelles (48).

L'hydrolyse des lipides complexes et des vitamines liposolubles est la première étape indispensable au processus de digestion afin qu'ils puissent être solubilisés au sein de fines gouttelettes lipidiques (49). Au niveau de l'intestin grêle ce processus fait intervenir plusieurs systèmes enzymatiques majeurs sécrétés par le pancréas : le système lipase/colipase, la lipase pancréatique, la carboxylester hydrolase (CEH) et la phospholipase A2 (PLA2). En effet, seules les formes libres peuvent être absorbées par la muqueuse intestinale, ce qui fait de la lipolyse enzymatique une étape essentielle à l'absorption intestinale des lipides. Le système lipase/colipase de la bile et les sucs pancréatiques vont permettre de décomposer les triglycérides en 2-monoacylglycérol (2-MG) et deux acides gras libres (50). Les phospholipides, dont les phosphatidylcholines, sont, quant à eux, hydrolysés en position 2 par la phospholipase A2 (PLA2) et vont libérer un acide gras libre et une lyso-phosphatidylcholine (51). Enfin, le dernier système enzymatique, à savoir la carboxylester hydrolase (CEH), permet d'hydrolyser les esters de cholestérol, libérant ainsi le cholestérol et un acide gras (52) mais également les esters de tocophérol retrouvés dans l'alimentation (53).

Les produits d'hydrolyse lipophiles vont être solubilisés au sein de micelles formées par les acides biliaires. Ces micelles vont jouer le rôle de transport des acides gras, du cholestérol et des vitamines liposolubles au niveau de la bordure en brosse des entérocytes (54).

b) Transport dans l'entérocyte

Après l'étape enzymatique, l'ensemble des produits d'hydrolyse des lipides alimentaires sont absorbés par l'entérocyte au niveau des microvillosités du pôle apical (bordure en brosse). En effet, les entérocytes sont des cellules polarisées jouant le rôle d'interface entre la lumière intestinale, côté apical, et la circulation lymphatique et veineuse côté basolatéral. Au niveau de la bordure en brosse, se trouvent des pompes à protons Na^+/K^+

permettant le maintien d'un gradient de pH (55) par acidification du milieu. Lorsque le pH devient inférieur au pKa des acides gras, ils vont se protoner, provoquant, théoriquement la dissociation des micelles et la libération partielle de leurs constituants lipidiques (56). L'absorption entérocytaire des lipides fait intervenir deux mécanismes essentiels : une simple diffusion passive lorsque les concentrations en acides gras dans la lumière intestinale sont élevées et un transport actif lorsque les concentrations sont faibles. Les transporteurs protéiques mis en jeu regroupent la FABPm (Fatty Acid-Binding Protein), le FATP4 (Fatty Acid Transport Protein 4) et le FAT/CD36 (Fatty Acid Transporter) (57).

- La FABPm est une protéine de transport retrouvée aux pôles apical et basolatéral des entérocytes de l'intestin grêle et est essentiellement impliquée dans l'absorption des acides gras, des monoglycérides, des lysophospholipides et du cholestérol libre (58).
- Les FAT (fatty acid translocase), existant sous 6 isoformes, sont présentes à la membrane des entérocytes du jéjunum et de façon minoritaire au niveau du duodénum. Ces protéines jouent un rôle notable dans l'absorption des acides gras libres (59). Le CD36 est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à cette famille et est exprimée dans de nombreuses cellules (plaquettes, monocytes, adipocytes et cellules rétinienne) et en quantité importante dans l'intestin. Elle joue un rôle dans l'absorption des lipides et leur sécrétion dans la lymphe. Elle appartient à la famille des « récepteurs éboueurs » de classe B qui comprend également les protéines SR-BI (SCARB1) et SR-BII (SCARB2), les récepteurs « éboueurs » (récepteur de cellules apoptotiques présent au niveau des macrophages chez la Drosophile), les protéines LIMP-II (Lysosomal Integral Membrane Protein II) et les protéines SNMP-1 (Silk Moth-olfactory Neuron Membrane Protein). Ce récepteur est capable de lier de nombreux ligands y compris les collagènes de type I et IV, les phospholipides anioniques et les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*. Au niveau des macrophages, il est impliqué dans l'absorption des LDL oxydées, responsable de la transformation de ces cellules en cellules spumeuses à l'origine du développement de la plaque athérogène observée dans les maladies coronariennes. Ce récepteur est particulièrement impliqué dans les mécanismes d'absorption intestinale des acides gras à longue chaîne, mais surtout du cholestérol et de la vitamine E (60, p. 36).

Le cholestérol, quant à lui est absorbé par des mécanismes de transport actifs spécifiques faisant intervenir des transporteurs tels que CD36, SR-B1, et surtout le transporteur Niemann-Pick C1 like 1 (61)(62).

- Le « Scavenger Receptor Class B Type 1 » SR-B1 est une protéine transmembranaire appartenant à la famille des « récepteurs éboueurs » de classe B. Elle est exprimée dans une grande variété de tissus et plus particulièrement au niveau des tissus impliqués dans le métabolisme du cholestérol tels que le foie et les intestins. En effet, SR-B1 est un récepteur hépatique capable de fixer avec une forte affinité différents types de ligands tels que les lipoprotéines impliquées dans le transport des lipides et du cholestérol.
- Le récepteur Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) est un polypeptide transmembranaire localisé à la membrane apicale des entérocytes et des hépatocytes. Il joue un rôle prépondérant dans l'absorption intestinale du cholestérol et l'excrétion des stérols. NPC1L1 est la cible moléculaire de l'ézétimibe, un puissant inhibiteur de l'absorption du cholestérol largement utilisé dans le traitement de l'hypercholestérolémie.

En ce qui concerne l'absorption de la vitamine E, il est admis depuis une dizaine d'années que seule la diffusion passive ne suffit pas à expliquer la complexité de ce phénomène. On sait désormais, que la vitamine E emprunte les voies d'absorption du cholestérol *via* le transporteur du cholestérol, le SR-B1 (63) dont l'implication a été démontrée par Rebol et *al.* en 2006. De plus, il semble que les transporteurs CD36 et Niemann-Pick C1 like 1 décrit précédemment jouent également un rôle.

c) Transport intracellulaire de la vitamine E

Une fois incorporés dans la cellule intestinale, les lipides et les vitamines liposolubles vont être pris en charge par des transporteurs protéiques pour rejoindre le réticulum endoplasmique, lieu de synthèse et d'assemblage des lipoprotéines. Peu de données existent concernant le trafic intracellulaire de la vitamine E et à ce jour. Étant hydrophobe, la vitamine E se localise probablement dans les membranes des organites ou dans les gouttelettes lipidiques cytosoliques. Une étude visant à caractériser la localisation subcellulaire de la vitamine E a montré que la vitamine E pouvait s'accumuler dans les

membranes microsomales du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, ainsi que dans les membranes lysosomales et peroxysomales (64). De plus, il a été démontré qu'une protéine associée aux tocophérols (TAP) exprimée dans l'intestin se lie à la vitamine E dans les tissus humains (65), mais possède en réalité une très faible affinité pour les tocophérols. Les protéines TAP1, 2 et 3 de type Sec14p, également exprimées dans l'intestin humain, sont probablement de meilleurs candidats car elles semblent améliorer le transport des tocophérols aussi efficacement que la protéine de transport des tocophérols (α -TTP) retrouvée dans le foie (66). Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour confirmer définitivement leur rôle dans l'entérocyte.

d) Synthèse, assemblage et sécrétion des lipoprotéines intestinales

Les lipides étant hydrophobes, ils doivent être complexés à des protéines plasmatiques de transport, au sein de l'entérocyte, afin d'être transportés dans les circulations lymphatique et sanguine. Ces protéines, appelées apolipoprotéines s'associent aux lipides par des liaisons faibles, forment des particules complexes : les lipoprotéines. Ces particules se présentent sous forme d'une sphère avec une organisation précise permettant la « solubilité » des lipides : les protéines hydrophiles, les phospholipides et le cholestérol non estérifié se positionnent à l'interface aqueuse formant une membrane qui renferme un cœur hydrophobe composé de cholestérol estérifié et de triglycérides. Pour permettre les liaisons protéine-lipides à la base de cette organisation, les lipides préalablement hydrolysés dans la lumière intestinale, doivent être ré-estérifiés dans la cellule intestinale. Cependant, alors que les mécanismes de synthèse des triglycérides et des esters de cholestérol sont parfaitement étudiés, le métabolisme intra-entérocytaire de la vitamine E reste encore mal connu à ce jour. On sait cependant que la vitamine E est transportée par deux lipoprotéines majeures de l'intestin grêle : les chylomicrons et, dans une moindre mesure, les lipoprotéines de haute densité (HDL pour « High-Density Lipoproteins ») différenciées par leurs densités, leurs diamètres et leurs poids moléculaire. Leur différence de densité est due à la proportion en protéine, en effet plus le complexe contient de protéine plus la densité est importante, et plus il contient de lipide plus la densité diminue (67).

- *Les chylomicrons*

Les chylomicrons constituent les plus grosses lipoprotéines avec un diamètre de 75 à 450 nm. Elles sont également les moins denses ($d < 0.93$ g/ml) du fait de leur grande richesse en lipides. En effet, leur cœur hydrophobe contient près de 90% de triglycérides et d'esters de cholestérol. La couche membranaire est constituée d'une apolipoprotéine structurale essentielle : l'apoB48. (68). La synthèse des chylomicrons débute par l'assemblage des pré-chylomicrons dans le réticulum endoplasmique et se termine par une étape de maturation au sein de l'appareil de Golgi avant la sécrétion finale. La synthèse des pré-chylomicrons se fait de façon séquentielle. Dans un premier temps, des « lipoprotéines primitives » sont formées par translocation d'une quantité minimale de lipides autour de l'apolipoprotéine ApoB48 par action de la protéine MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein). Ces lipoprotéines primitives sont des particules de haute densité constituées d'une monocouche de phospholipides structurés autour des apolipoprotéines ApoB48 et ApoAIV renfermant une faible quantité de phospholipides, de cholestérol, et de triglycérides. Elles sont ensuite converties en lipoprotéines par une « expansion du noyau » impliquant la fusion des lipoprotéines primitives avec des gouttelettes lipidiques riches en triglycérides et en esters de cholestérol. Cette fusion conduit à la formation des pré-chylomicrons dans la lumière du réticulum endoplasmique (69).

Ce mécanisme n'étant possible que grâce à la présence de la protéine MTP (70), il est indispensable de la décrire. Il s'agit d'un hétérodimère, composé d'une large sous-unité de 97 kDa responsable de la liaison et du transfert des lipides, et d'une petite sous-unité de 55 kDa possédant une activité isomérase di-sulfide (PDI). La petite sous-unité est une protéine ubiquitaire permettant d'ancrer la grosse sous-unité à la membrane du réticulum endoplasmique et de la maintenir sous une forme soluble grâce à sa séquence KDEL (70). La protéine MTP joue un rôle majeur dans la stabilisation l'ApoB à un stade précoce de sa synthèse, et permet le transfert des lipides sur l'ApoB en cours de synthèse. Elle est exprimée essentiellement dans le foie et l'intestin, mais on la retrouve aussi au niveau des tissus ovariens, testiculaires et rénaux. Les mutations sur le gène de la MTP sont à l'origine d'une forme d'hypocholestérolémie primitive intestinale qui sera décrite ultérieurement.

Après leur biosynthèse dans la lumière du réticulum endoplasmique, les pré-chylomicrons sont transférés vers l'appareil de Golgi. Ce mouvement intra-cellulaire fait intervenir des vésicules de transfert. Leur formation commence par le recrutement de complexes protéiques, appelés COPII, qui vont venir se positionner sur des sites précis du réticulum endoplasmique : les sites de sortie du réticulum (ERES : Endoplasmic Reticulum Exit Sites) (71). Le complexe COPII est composé de cinq protéines : Sar1, Sec23, Sec24, Sec13 et Sec31. Ces protéines forment une structure rigide en forme de nœud papillon, avec une face concave qui va donner leur courbure aux vésicules de transport. Les cellules de mammifères produisent deux isoformes de Sar1, appelées Sar1a et Sar1b, qui sont toutes deux exprimées dans les entérocytes (72).

Sar1 est la première protéine du complexe COPII recrutée à la membrane du réticulum endoplasmique. Sar1 est une petite GTPase de la famille des GTPases ARF, dont l'activité, dépend du degré de phosphorylation du nucléotide auquel elle est liée (73). A l'état inactif, Sar1 est liée au GDP (Sar1-GDP). Elle va pouvoir être activée par Sec12, un facteur d'échange de guanine (GEF) retrouvée exclusivement à la membrane du réticulum endoplasmique (74), qui va catalyser la conversion du GDP en GTP ce qui provoque l'exposition d'une hélice α N-terminale de Sar1 qui peut alors s'ancrer au réticulum endoplasmique et initier le bourgeonnement de la membrane (75). Par la suite, la protéine Sar1-GTP recrute en cascade l'hétérodimère Sec23-Sec24 qui forme la couche intérieure de la vésicule puis le complexe Sec13-Sec31 qui complète la structure du manteau conduisant ainsi à la génération d'une vésicule.

A ce stade, il est important de soulever un problème : la taille des chylomicrons varie de 75 à 450 nm (69) tandis que les vésicules COPII classiques ne mesurent que de 60 à 70 nm. Il semblerait donc que les pré-chylomicrons empruntent une voie alterne donnant naissance à des vésicules de transport des pré-chylomicrons (PCTV pour Pre-Chylomicron Transport Vesicle) (76). Dans cette voie, le complexe (COPII) ne semble pas nécessaire au bourgeonnement du PCTV provenant du RE mais semble indispensable à la fusion de la vésicule avec le cis-Golgi (77). En revanche, la protéine L-FABP et la Protéine Kinase C interviennent dans la biogenèse des PCTV (77). Une fois les PCTV libérés de la membrane du réticulum endoplasmique, ceux-ci vont fusionner avec le cis-Golgi. Cette fusion fait intervenir, de façon classique, la superfamille des protéines appelée "Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor" ou protéines SNARE considérées, depuis 2013 (Prix Nobel de Physiologie et Médecine

2013), comme étant au cœur des processus d'exocytose. Après une étape de maturation finale dans le Golgi, les chylomicrons sont acheminés vers la membrane basolatérale où ils sont rejetés par exocytose et transportés dans la lymphe avant de rejoindre la circulation sanguine.

- *Les HDL intestinales*

Comme évoqué au début du paragraphe, bien que la vitamine E suive majoritairement la voie métabolique des triglycérides et des chylomicrons, il a été démontré qu'elle suivait aussi une voie métabolique spécifique du cholestérol : les HDL intestinales structurées autour de l'apolipoprotéine A1 et sécrétées *via* un mécanisme dépendant de ABCA1 (78). L'idée que la vitamine E soit sécrétée selon deux voies métaboliques est née en 1997 lorsque Makoto Arita et ses collègues ont étudié la sécrétion de vitamine E dans des cellules de foie surexprimant la protéine de transfert de l' α -tocophérol (α TTP). La surexpression de l' α TTP a entraîné une augmentation de la sécrétion de l' α -tocophérol par les cellules transfectées. Cependant, alors que la brefeldine A (perturbateur de la structure des compartiments membranaires et en particulier de l'appareil de Golgi) a inhibé la sécrétion de triglycérides (qui se fait *via* les VLDL au niveau hépatique), aucun effet n'a été observé sur la sécrétion d' α -tocophérol. Ces résultats suggèrent que les cellules hépatiques sont capables de sécréter l' α -tocophérol indépendamment de la sécrétion de VLDL (79). Plus tard, les études d'Oram, de Vaughan et de Stocker (80) ont montré qu'il existait une voie de sécrétion de vitamine E insensible à l'action de la brefeldine A mais induite par un transporteur du cholestérol : l'ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1). De plus, il a été démontré que l'ablation de ABCA1 chez la souris entraînait une carence en vitamine E (81). En parallèle, Jahangir Iqbal et M. Mahmood Hussain ont mis en évidence, chez la souris, deux voies complémentaires d'absorption intestinale du cholestérol (82). À la suite de ces résultats encourageants, il a été envisagé que la vitamine E possède également deux voies d'absorption au niveau intestinal. Cette théorie a été validée par les travaux de Anwar et *al.* menés sur des cellules Caco-2 (cellules d'adénocarcinome du côlon humain capables d'exprimer par différenciation les caractéristiques de cellules intestinales adultes). En effet, en présence d'inhibiteur de la voie des chylomicrons (BMS197636, antagoniste de la MTP ou brefeldine) la sécrétion d' α -tocophérol au pôle basolatéral était diminuée mais pas

inexistante. Par ailleurs, l'incubation des cellules en présence d'HDL exogène augmente la sécrétion d' α -tocophérol suggérant l'existence d'une deuxième voie de sécrétion d' α -tocophérol dépendante des HDL (64). Finalement, l'hypothèse a été définitivement confirmée grâce aux travaux de Reboul et *al.* chez la souris *ABCA*^{-/-} qui ont confirmé que l'importance du transporteur ABCA1, et donc des HDL, dans la sécrétion de l' α -tocophérol par les cellules intestinales (83). Très récemment, une étude a montré que le transporteur ABCG1 est également impliqué dans l'efflux cellulaire de vitamine E (84).

e) Facteurs affectants la bioaccessibilité de la vitamine E

La bioaccessibilité se définit par la fraction de vitamine E réellement solubilisée dans les micelles par rapport à la quantité initiale de vitamine E fournie par l'alimentation. Il est généralement admis que la part de vitamine E absorbée par l'épithélium intestinal chez l'Homme représente 50 à 70 % du total ingéré (taux inférieur à celui des autres vitamines liposolubles, telle que la vitamine A) et est étroitement liée à la digestion et à l'absorption des lipides (48). Ces variations interindividuelles sont donc majoritairement liées aux différences de composition du bol alimentaire car les lipides favorisent l'extraction de la vitamine E de sa matrice alimentaire, stimulent la sécrétion biliaire et favorisent la formation de micelles. A l'inverse, d'autres nutriments retrouvés dans le bol alimentaire peuvent diminuer cette bioaccessibilité. Pour exemple, l'acide rétinoïque (85), les stéroïdes végétaux (86), l'acide eicosapentaénoïque (87), l'alcool (87) et les fibres alimentaires (88) sont connus pour interférer avec l'absorption de la vitamine E.

2. Métabolisme hépatique de la vitamine E

a) Prise en charge par l' α -TTP

Alors que le transport de la vitamine E dans le plasma se fait de façon non spécifique par les lipoprotéines, elle possède un transporteur intracellulaire spécifique : l' α -TTP retrouvée majoritairement au niveau du foie (89). Il s'agit d'une protéine de transport spécifique à l' α -tocophérol capable de discriminer les différentes formes de tocophérol et responsable de la sélection préférentielle de la forme RRR- α -tocophérol. En effet, afin que la liaison entre les différentes formes de vitamine E et l' α -TTP soit possible, trois conditions doivent être réunies : la présence de trois groupes méthyles sur le noyau

chromanol (en particulier en position C5), un groupe hydroxyle libre et la présence d'une chaîne latérale phythyle (90). Or, l' α -tocophérol satisfait à ces trois conditions (91), au contraire du γ -TOH (90). De plus, l'affinité de l' α -TTP pour les différentes formes de vitamine E est parfaitement corrélée à l'activité biologique de chaque molécule mesurée à l'aide du test de résorption-gestation chez le rat (92), soutenant l'hypothèse selon laquelle l' α -TTP est responsable de la sélection préférentielle de l' α -TOH est fortement soutenue (79).

Le rôle principal de l' α -TTP est de maintenir l'homéostasie de l' α -TOH dans le plasma et les tissus extra hépatiques (93). Cette fonction est assurée en facilitant le transport de l' α -tocophérol des lysosomes vers les membranes des cellules (94), permettant une exocytose continue de ce dernier du foie vers la circulation sanguine *via* ABCA1(95). A la sortie du foie, la vitamine E est complexée aux VLDL et suit le métabolisme de ces lipoprotéines pour être distribuée dans les tissus. Les principaux lieux de stockage de la vitamine E, en plus du foie, sont le tissu adipeux, et les muscles. Les mécanismes impliqués dans la captation cellulaire ne sont pas encore totalement élucidés mais le LDLR et SR-BI semblent en être les principaux acteurs (96).

b) Métabolisme intra-hépatique

Le processus de dégradation hépatique de la vitamine E est encore flou sur certains aspects. Cependant, il est admis que le métabolisme de l' α -tocophérol suit le schéma classique du processus d'élimination des xénobiotiques découpés en réactions de phase I, de phase II et de phase III. Toutes les molécules seraient donc dégradées en métabolites spécifiques de chaque vitamère avec un noyau chromanol intact (ce qui permet de conserver la nomenclature α -, β -, γ - et δ -) et une chaîne latérale dégradée.

La phase I du métabolisme de l' α -tocophérol a lieu dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes et consiste en une ω -hydroxylation de la chaîne latérale aliphatique par les cytochromes CYP4F2 ou CYP3A4 (hémoprotéines retrouvées notamment dans le système microsomal des hépatocytes), conduisant à la formation de l' α -13'-hydroxychromanol (α -13'-OH). Cette réaction est l'étape limitante du métabolisme de l' α -tocophérol. Ce métabolite va alors subir deux étapes d' ω -oxydation, catalysée par une alcool-déshydrogénase puis une aldéhyde-déshydrogénase afin d'être transformé en α -13'-carboxychromanol (13'-COOH). Ces deux métabolites à longue chaîne (LCM), présentent une activité biologique élevée *in vitro via* leur capacité à induire l'apoptose et

à s'opposer à aux processus inflammatoires et semble même avoir une influence sur l'homéostasie lipidique. Les chaînes latérales de ces métabolites ayant une structure similaire à celle des acides gras branchés (« branched-chain fatty acids »), sont prises en charge comme ces derniers et subissent cinq cycles de β -oxydation dans les peroxysomes, après avoir été estérifiés par un acyl-CoA. On observe alors un raccourcissement de la chaîne latérale et une libération de molécules d'acétyl-CoA. Chaque étape de β -oxydation donnera donc des intermédiaires métaboliques à chaîne moyenne (ICM) qui seront transportés vers la mitochondrie. Les mécanismes de transport de ces molécules hors du peroxysome sont inconnus et leur incorporation dans les mitochondries est sujette à débat, bien qu'il ait été suggéré que ce transport se fasse grâce à la carnitine acyl-transférase. Au sein de la mitochondrie, les ICM subissent de nouvelles étapes de β -oxydation pour former les métabolites finaux que sont les métabolites à chaîne courte (SCM) regroupés sous le terme de carboxy-éthyl-hydroxychromanols (CEHC ou 3'-COOH) (figure 6) (97). Ces métabolites ont été les premiers à être découverts. Cette voie métabolique est la voie majoritaire de dégradation de l' α -tocophérol mais elle a également été confirmée pour les autres formes de tocophérol (98) (99). A chaque étape de leur catabolisme, les métabolites peuvent être modifiés par conjugaison. On retrouve donc des métabolites sulfatés ou glucuronidés, mais également des métabolites conjugués à la glycine ou à la taurine (100).

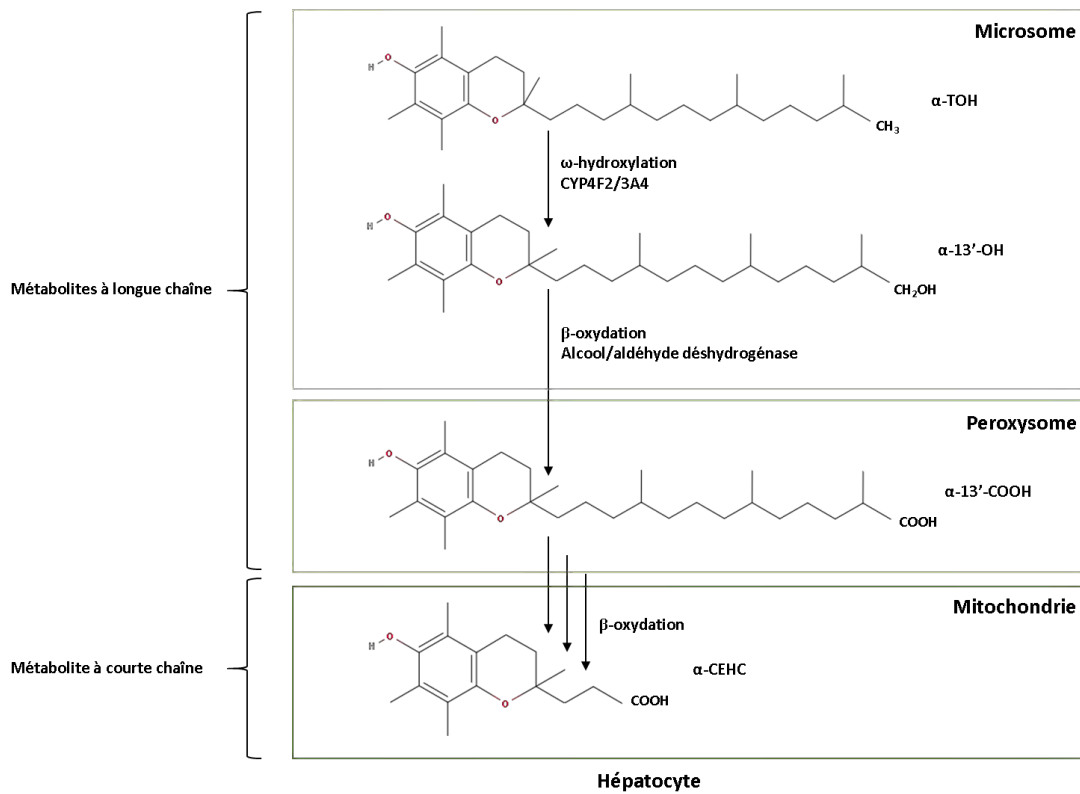


Figure 6. Métabolisme intra-hépatique de la vitamine E. α -TOH = α -tocophérol ; α -13'-OH = α -13'-hydroxychromanol ; α -13'-COOH = α -13'-carboxychromanol ; α -CEHC = α -carboxy-éthyl-hydroxychromanols (d'après Traber et al. 2007)

3. Distribution

Aucune protéine de transport plasmatique spécifique de l' α -tocophérol n'a été décrite à ce jour (87). Le transport vasculaire de la vitamine E suit en grande partie celui du cholestérol et des lipoprotéines (101). En condition post-prandiale physiologique, la vitamine E est principalement transporté *via* les chylomicrons intestinaux, les VLDL et les HDL hépatiques, tandis qu'en situation de jeun, elle est principalement associée aux LDL (102). La répartition de l' α -tocophérol entre les différents types de lipoprotéines est assez difficile à définir du fait d'une grande variabilité interindividuelle autant chez l'Homme que chez l'animal. Cependant, en post-prandial, la vitamine E rejoint le système lymphatique majoritairement *via* les chylomicrons puis intègre la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière. Dans le plasma, les chylomicrons contenant les triglycérides et la vitamine E vont être hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL) libérant ainsi des acides gras, mais aussi une petite partie de l' α -tocophérol, qui seront rapidement captés par les tissus (103). La majorité de la vitamine E encore associée aux « remnants » de chylomicrons (particules issues de l'hydrolyse incomplète des chylomicrons), sera finalement captée par le foie. En effet, le foie est un site majeur de stockage de la vitamine E puisqu'il contient près d'un tiers des réserves totales (102). La capture des remnants de chylomicrons par le foie se fait grâce aux récepteurs aux LDL (LDLR) comme le récepteur SR-B1. Une fois endocytées au niveau hépatique, les lipoprotéines subissent une hydrolyse finale qui permettra la libération de l' α -tocophérol. Il sera alors soit pris en charge par l' α -TTP soit métabolisé puis excrété dans la bile (104).

Les HDL, quant à elles, permettent le transport inverse de la vitamine E c'est-à-dire des tissus extra-hépatiques vers le foie. Ces lipoprotéines contiennent quantitativement le moins de vitamine E par particule mais semblent être la forme de transport privilégiée pour délivrer la vitamine E aux tissus (101). L'une des hypothèses serait que les particules HDL possèdent plus de sites de liaison à l' α -tocophérol par rapport aux autres particules. En effet, l'importance de la fraction HDL dans l'apport d' α -tocophérol au niveau du système nerveux central a été démontrée par Goti et al. (105) mais elle a également été montrée au niveau des pneumocytes de type 2 (101). De plus, il a été suggéré que l'apport de vitamine E par les HDL pourrait être augmenté en situation de stress oxydatif (101). La captation de la vitamine E par les tissus se fait essentiellement grâce au récepteur SR-B1 (101).

Enfin, il a été démontré que l' α -tocophérol peut se déplacer activement entre les différentes classes de lipoprotéines (106) grâce à l'intervention de la protéine plasmatique de transfert des phospholipides (PLTP) qui assure les échanges entre les différentes classes de lipoprotéines mais également entre les HDL et les membranes des cellules des tissus cibles (107).

4. Excrétion

Du fait de leur polarité, les ICMs et les SCMs, (*i.e.* le 5'-COOH et les CEHCs), sont excrétés *via* l'urine, principalement sous forme de conjugués glucosidés (98). Les métabolites à longue chaîne sont, quant à eux, éliminés par voie biliaire sous forme non-conjuguée (108). On peut également retrouver l'ensemble des métabolites de la vitamine E dans les fèces, y compris les métabolites des tocotriénols (98). Cependant, les métabolites à chaînes longues (en particulier les 13'-COOH) restent majoritaires et représentent plus de 60% de métabolites totaux (108). Récemment, deux métabolites produits par des voies métaboliques alternatives, ont été décrits : le 12'-hydroxychromanol (γ - et δ -12'-OH) et le 11'-hydroxy-chromanol (γ - et δ -11'-OH). Ces métabolites ont été retrouvés dans les matières fécales (89).

Pour résumer, les tocophérols et tocotriénols sont d'abord catabolisés en métabolites à chaîne longue (9 à 13 carbones) qui peuvent être conjugués et/ou sécrétés dans la bile ou oxydés en métabolites à chaîne intermédiaire (7 à 5 carbones) puis courte, plus hydrophiles, qui seront également conjugués et éliminés *via* l'urine.

- Mécanismes moléculaires

A ce jour, aucune protéine de transport spécifiques aux carboxy-éthyl-hydroxychromanols, conjugués ou non, n'a été décrite. Cependant, certains transporteurs habituellement impliqués dans la phase III du métabolisme semblent également jouer un rôle dans l'élimination de la vitamine E, et leur expression semble même régulée par cette dernière (104).

L'Apo-B semble impliquée dans la sécrétion de l' α -tocophérol par les cellules hépatiques vers le milieu vasculaire mais aussi vers les voies biliaires. En effet, des souris *ApoB-KO* ont présenté une diminution significative de la sécrétion biliaire d' α -tocophérol après une injection de 25 mg / kg d' α -tocophérol par rapport aux contrôles (109). De même,

Mardones et *al.* (110) ont montré que le transporteur SR-B1 participe à l'excrétion biliaire de la vitamine E puisqu'elle était inférieure de 74% à 81% chez les souris déficientes en SR-B1 par rapport aux contrôles, bien que la concentration hépatique soit restée inchangée. Selon Takada et Suzuki (111), SR-B1 permettrait l'absorption de la vitamine E dans les hépatocytes, au niveau baso-latéral, mais aussi l'exportation dans la bile lorsque le récepteur est exprimé à l'interface entre l'hépatocyte et les cellules canaliculaires.

Les protéines associées à la multirésistance aux médicaments (« multidrug resistance proteins » ou MDR) sont également impliquées dans l'élimination de l' α -tocophérol. En effet, l'inhibition de l'expression du gène MDR2 codant pour la Glycoprotéine P (transporteur transmembranaire de la membrane plasmique appartenant à la super-famille des transporteurs ABC capable d'expulser, grâce à l'énergie fournie par l'ATP, des substrats spécifiques), au niveau canaliculaire entraîne une diminution de l'excrétion biliaire de vitamine E chez le rat et la souris (112). Cependant, les résultats d'études *in vitro* menée sur MDR1 n'ont pas révélé de résultats clairs. En effet, aucun effet n'a été observé sur l'expression de MDR1 dans les cultures primaires d'hépatocytes humains après traitement avec des tocophérols tandis qu'une nette augmentation a été observée dans les cellules intestinales LS180 (113).

Ainsi, à ce jour beaucoup d'aspects concernant l'implication de transporteurs dans l'excrétion de la vitamine E et de ses métabolites sont encore flous.

5. Résumé sur le métabolisme de la vitamine E

On retiendra donc que le métabolisme de la vitamine E est très étroitement lié à celui des lipides et des lipoprotéines. Ainsi, le taux d'absorption de l' α -tocophérol est voisin de 70% et est conditionné par la présence de sels biliaires, de lipase pancréatique, et de tous les acteurs intracellulaires intervenant dans la biosynthèse des lipoprotéines mais aussi par la teneur en lipides de la ration alimentaire. La concentration plasmatique d' α -tocophérol est corrélée à celle du cholestérol total et des phospholipides puisque, dans la circulation générale, la vitamine E est surtout présente au sein des LDL et des HDL. Bien qu'il n'y ait pas de transport vasculaire spécifique de la vitamine E, on sait qu'elle peut exister sous forme liée à l'albumine. La vitamine E est ensuite métabolisée au niveau du

foie pour être éliminée soit par voie biliaire, soit par voie urinaire. Le métabolisme de la vitamine E est résumé dans la figure 7 ci-dessous.

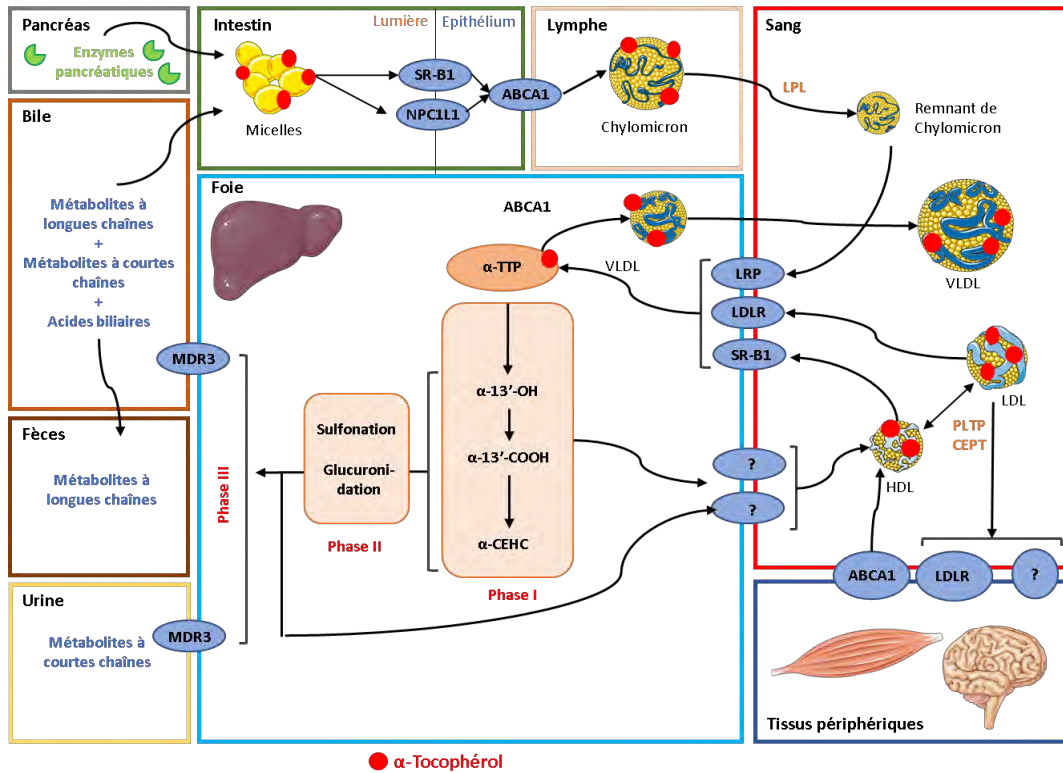


Figure 7. Absorption, transport et métabolisme de la vitamine E (d'après Schmölz L, et al.2016)

III. VITAMINE E EN SANTÉ HUMAINE

Les rôles biologiques de la vitamine E sont étroitement liés à la structure chimique étudiée précédemment. En effet, du fait de sa nature lipophile, la vitamine est présente dans toutes les membranes des cellules animales au sein desquelles elle joue un rôle crucial de protection de leur intégrité structurale. De plus, elle est impliquée dans de nombreux mécanismes physiologiques que ce soit au niveau neurologique, immunitaire ou métabolique.

A. ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

Le stress oxydant a été défini par Sies pour la première fois en 1985. Il a été défini comme étant un syndrome résultant d'un déséquilibre entre les systèmes de défense antioxydants et la production de radicaux libres oxygénés. Ce déséquilibre peut avoir diverses origines : déficit nutritionnel en antioxydant, surproduction endogène d'origine inflammatoire, exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (114). Les radicaux libres, quant à eux, sont définis comme des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbitale externe, générés lors de la scission homolytique d'une liaison covalente. Au cours du métabolisme normal, de nombreuses espèces réactives de l'oxygène (ROS) et espèces réactives de l'azote (RNS) sont produites, car elles sont indispensables au bon fonctionnement de l'organisme (rôle de défense, vasodilatation, anti-agrégation plaquettaire, neurotransmission, signalisation cellulaire, *etc.*). Or, du fait de l'existence d'un électron libre, ces espèces sont fortement instables et capables de déstabiliser d'autres molécules de l'environnement cellulaire, notamment les acides gras polyinsaturés (AGPI). Ainsi, un radical libre peut réagir avec un lipide cellulaire (LH) pour donner un radical peroxyde (L°) capable, à son tour, d'attaquer d'autres acides gras et de former un hydroperoxyde (LOOH) et un nouveau radical libre, créant une réaction en chaîne de lipoperoxydation. En l'absence de processus de défense capable de stopper cette réaction en chaîne, l'intégrité de la cellule entière peut être mise en danger (115). Autour de cette ambiguïté entre danger et besoins en radicaux libres, la nature a développé de puissants systèmes de défenses antioxydantes permettant de contrôler et de maîtriser le plus précisément possible ce métabolisme.

Ainsi, il est à présent bien établi que la vitamine E est, de loin, l'antioxydant liposoluble le plus puissant chez l'Homme, capable de stopper très précocement la propagation du processus de peroxydation lipidique (116). En effet, du fait de son caractère hydrophobe et de la présence du système phénolique poly-hydroxylés du noyau chromane capable de stabiliser par résonance l'électron célibataire, la vitamine E est un libérateur d'hydrogène (117). Ce système est d'autant plus stable que le noyau est porteur de substituants donateurs d'électrons tels que les méthyles, expliquant la réactivité supérieure de l' α -tocophérol par rapport aux autres tocophérols. La cinétique et les données moléculaires disponibles suggèrent que les propriétés antioxydantes de cette vitamine sont uniques dans le panorama des micronutriments phénoliques. Ainsi, chaque molécule d' α -tocophérol peut donner deux électrons aux radicaux peroxydes (LOO^\bullet) pour générer le radical tocophéroxyle ($\alpha\text{-TO}^\bullet$) et un hydroperoxyde (LOOH) (Figure 8). Ce radical évoluera rapidement vers des composés stables tels que la tocophéryl-quinone (118) ou bien sera régénéré par le glutathion réduit ou l'acide ascorbique (vitamine C) et les réductases NADH-dépendantes (119). La capacité antioxydante de l' α -tocophérol permet donc de protéger les bicouches lipidiques des organismes vivants telles que celles des membranes cellulaires ou des lipoprotéines de faible densité (LDL).

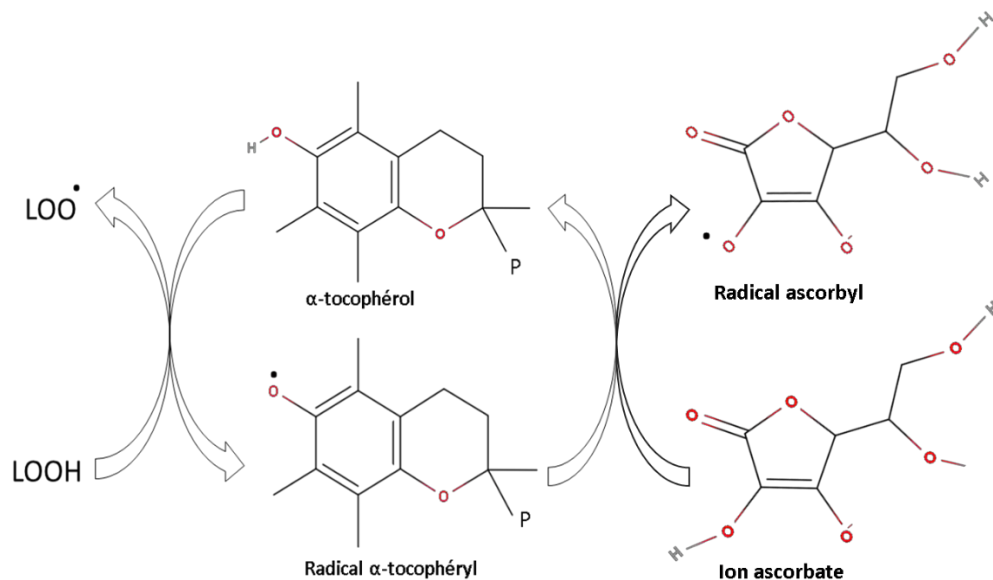


Figure 8. Mécanisme d'action de l' α -tocophérol dans la prévention de la propagation du processus de peroxydation lipidique

Grâce à ses propriétés antioxydantes uniques, des premières études ont montré que la vitamine E pouvait prévenir la peroxydation lipidique et l'hépatotoxicité induites par un oxydant puissant : le tétrachlorométhane (CCl₄), ce qui demeure à ce jour, un élément de preuve pertinents sur le plan clinique du rôle protecteur de la vitamine E dans les tissus (120).

Il est intéressant de noter qu'en raison de l'absence d'un des groupes méthyle donneurs d'électrons sur le cycle chromanol, le γ -tocophérol semble avoir une moindre activité antioxydante. Ainsi, l' α -tocophérol est généralement considéré comme un meilleur inhibiteur de la peroxydation lipidique que le γ -tocophérol (121). Cependant, la position C-5 non substituée du γ -tocophérol semble le rendre plus apte à piéger les électrophiles lipophiles tels que les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (peroxynitrite, dioxyde d'azote et les espèces générées par la myéloperoxydase ou la superoxyde dismutase). Ainsi, certaines études ont montré que le γ -tocophérol est plus puissant que l' α -tocophérol pour éliminer le dioxyde d'azote et ses dérivés (122). En effet, parce que le cycle chromanol de l' α -tocophérol est entièrement substitué, cette forme de vitamine E ne peut pas former de composés « nitroso- » stables (123) à l'inverse du γ -tocophérol capable de former le 5-nitro- γ -tocophérol (124).

B. MÉCANISMES D'ACTION DE L'ALPHA-TOCOPHÉROL AU NIVEAU CELLULAIRE

Outre ses fonctions antioxydantes, il est désormais admis que la vitamine E intervient dans certains processus cellulaires, par d'autres mécanismes que ceux liés à son activité antioxydante. En effet, un premier élément de preuve a été mis en évidence grâce au modèle animal chez qui les symptômes d'une carence profonde en vitamine E, ne pouvaient être efficacement guéris par des antioxydants phénoliques autres que la véritable vitamine E elle-même. En parallèle, chez l'Homme, les carences en α -tocophérol ont été associées à un risque accru de maladies coronariennes alors qu'une supplémentation en vitamine E semble avoir un effet protecteur (125). Depuis ces constats, l'intérêt scientifique dans la compréhension du rôle que joue la vitamine E face à la progression de l'athérosclérose s'est accrue pour aller au-delà de son seul rôle connu face à l'oxydation des LDL. Ainsi, l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires

lisses, la préservation de la fonction endothéliale, l'inhibition de l'adhérence monocyte-endothélium, l'inhibition de la libération d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines par les monocytes, ainsi que l'inhibition de l'adhérence et de l'agrégation plaquettaires sont des exemples de mécanismes cellulaires régulés par l' α -tocophérol (126). Ces régulations se font tant à un niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel.

1. Régulations transcriptionnelles

Tout d'abord, l' α -tocophérol semble avoir la capacité de réguler certains gènes. En effet, chez le rat, l'expression de l' α -TTP est régulé par une carence en vitamine E tout comme l'expression de certains gènes codant pour les récepteurs « éboueurs », impliqués dans l'absorption des LDL oxydées. L' α -tocophérol semble diminuer la transcription des gènes codant pour les récepteurs SR-A (127) et CD36 (128) (effet non retrouvé avec le β -tocophérol). Le rôle de la vitamine E sur l'expression de CD36 a été testé *in vitro* et *in vivo*. Notamment, la supplémentation en vitamine E de lapins nourris au cholestérol a permis de diminuer les lésions athérosclérotiques induites par le cholestérol *via* une diminution de l'expression du récepteur CD36 (129). Ces résultats sont conformes aux données antérieures obtenues *in vitro* sur les cellules musculaires lisses et les macrophages humains (130). Récemment, il a été montré, chez la souris *ApoE* (-/-) (l'apolipoprotéine E est une classe d'apolipoprotéines retrouvée dans les chylomicrons, essentielle à leur catabolisme), que la supplémentation en vitamine E diminuait l'expression de CD36 mais augmentait l'expression des gènes PPAR γ et LXR α qui active ABCA1 et entraîne une augmentation de l'efflux du cholestérol (131). Une autre étude a montré un rôle positif de la vitamine E sur l'expression du gène Nrf2 qui, associée à l'induction du gène PPAR γ , entraîne une inhibition de la métalloprotéases matricielles de type 1 (MMP-1). Or les métalloprotéases jouent un rôle majeur dans la déstabilisation de la plaque d'athérome et dans l'inflammation (132).

A l'inverse, l' α -tocophérol induit l'expression des gènes codant pour le CTGF (« connective tissue growth factor », protéine de la matrice extracellulaire impliquée dans l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération, l'angiogenèse et la cicatrisation) (133) et pour l' α -tropomyosine (134), diminuant ainsi la contractilité des cellules musculaires lisses et la prolifération cellulaire.

L' α -tocophérol joue aussi un rôle dans l'expression de gènes impliqués dans la voie de synthèse du cholestérol, puisqu'il diminue l'expression du gène codant pour le CYP27A1, ce qui entraîne une diminution des concentrations en oxystérol qui sont les principaux ligands des Liver X Receptors (LXR), impliqué dans l'activation du gène de ABCA1 (135)

Ainsi, un certain nombre de processus cellulaires semblent être directement régulés par l' α -tocophérol, à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, indépendamment de son activité antioxydante. Cependant, l'intégralité des mécanismes mis en jeu restent à ce jour encore mal connus.

2. Régulations post-transcriptionnelles

Après son rôle de régulation génique, la vitamine E semble intervenir dans la régulation directe de certaines protéines. En effet, l'un des premiers rôles de la vitamine E a été mis en évidence en 1991 lors de la découverte de sa capacité à inhiber la croissance des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire en agissant spécifiquement sur la Protéine Kinase C (PKC) (136). Il s'agit du premier cadre expérimental où l' α -tocophérol modifie une activité enzymatique de façon convaincante et ce, indépendamment de ses actions antioxydantes. En effet, cette observation a été faite à des concentrations physiologiques et de façon spécifique à l' α -tocophérol puisque le β -tocophérol, le trolox (analogue synthétique) et les esters d' α -tocophérol sont inactifs. Par la suite, de nombreuses études ont montré cette capacité d'inhibition de la croissance cellulaire (*via* la PKC) dans les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les fibroblastes et les cellules glomérulaires rénales (137). En réalité l' α -tocophérol n'agit pas directement sur la PKC mais stimule la Protéine Phosphatase 2A (PP2A) qui va déphosphoryler la PKC et l'inhiber. Dans les monocytes humains, l'inhibition de la PKC par l' α -tocophérol entraîne une diminution de la translocation et de la phosphorylation du facteur cytosolique p47^{phox} altérant ainsi l'assemblage de la NADPH-oxydase et diminuant par conséquent la production d'anions superoxydes (138). Une étude a aussi rapporté qu'un traitement par l' α -tocophérol pouvait prévenir l'atteinte glomérulaire et la néphropathie chez le rat diabétique (139). Cet effet protecteur semblait également lié à l'inhibition de la Protéine Kinase C. En effet, l' α -tocophérol activerait la diacylglycérol kinase, ce qui entraînerait une diminution des concentrations cytosoliques en diacylglycérol et une diminution de l'activation de la Protéine Kinase C. Dans ces études, l'hyperglycémie était responsable

de l'augmentation de la synthèse de diacylglycérol contrecarrée, en présence d' α -tocophérol, par l'activation de la diacylglycérol kinase. De même, dans les fibroblastes humains, l'inhibition de la Protéine Kinase C semble avoir diminué l'expression de la collagénase (140).

L' α -tocophérol semble également diminuer de façon significative la libération d'interleukine-1 β (IL-1 β) *via* l'inhibition de la 5-lipoxygénase (141) et l'adhésion des monocytes à la paroi endothéliale *via* une action négative sur les protéines d'adhésion « InterCellular Adhesion Molecule » (ICAM-1 ou CD54) et « Vascular cell adhesion protein 1 » (VCAM-1 ou CD106) (142).

C. RÉGULATION DES FONCTIONS CELLULAIRES INTÉGRÉES

1. Inhibition de la prolifération cellulaire

Chez le rat, l' α -tocophérol inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses, alors que le β -tocophérol est inefficace ce qui suggère une action directe de l' α -tocophérol et non une action médiée par la diminution de radicaux libres. De plus, le métabolite oxydé de l' α -tocophérol, l' α -tocophérylquinone, ne présente aucun effet similaire, appuyant l'idée que les effets observés ne sont pas liés à ses propriétés antioxydantes (143). Ce contrôle de la prolifération cellulaire a, par la suite, été observé dans un certain nombre de lignées cellulaires différentes.

2. Inhibition de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire

Il a été montré, *in vitro* et *in vivo*, que l' α -tocophérol inhibe l'adhésion et l'agrégation plaquettaire par un mécanisme dépendant de la Protéine Kinase C (126) (144). Une autre étude a montré que l' α - et le γ -tocophérol diminuent l'agrégation plaquettaire et retardent la formation de thrombus artériel. Le fait que l'action du γ -tocophérol soit significativement plus importante que celle de l' α -tocophérol suggère qu'un simple mécanisme antioxydant simple ne peut expliquer cet effet puisque le γ -tocophérol est beaucoup moins antioxydant que l' α -tocophérol (145).

3. Inhibition de l'adhésion endothéliale des monocytes

Des études ont montré que l'augmentation de la concentration en α -tocophérol dans les monocytes entraîne une diminution de leur capacité d'adhésion aux cellules endothéliales en réponse aux LDL, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (146) (147). Cet effet serait lié à l'inhibition de l'expression de molécules d'adhésion. Cet événement joue un rôle crucial dans les premiers stades d'apparition de l'athérosclérose.

D. LIENS ENTRE MÉCANISMES CELLULAIRES ET PATHOLOGIES

1. Athérosclérose et complications cardiovasculaires

L'athérosclérose et les complications cardiovasculaires associées telles que les accidents vasculaires cérébraux et l'infarctus du myocarde sont des causes majeures de morbidité et de mortalité. L'hypercholestérolémie est le facteur de risque le plus étroitement associé au risque d'athérosclérose. Bien qu'il existe encore des controverses à ce sujet, liées à des études cliniques montrant un effet négatif de la supplémentation en vitamine E sur le risque de maladies cardiovasculaires, les mécanismes décrits ci-dessus ainsi que certaines études cliniques suggèrent fortement que la vitamine E pourrait prévenir l'athérosclérose. En effet, les mécanismes décrits précédemment, à savoir l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses, la préservation de la fonction endothéliale, l'inhibition de l'adhésion endothéliale des monocytes, la captation des espèces réactives, la diminution de la libération de cytokine et l'inhibition de l'adhésion et de l'agrégation des plaquettes sont autant d'éléments qui semblent a priori en faveur d'un effet protecteur de la vitamine E contre le phénomène d'athérosclérose. A cela s'ajoute les preuves obtenues chez le lapin nourris au cholestérol (148) et les effets démontrés sur l'expression du récepteur CD36 jouant un rôle central dans la physiopathologie de l'athérosclérose. Pourtant, une question subsiste : pourquoi les effets positifs de la vitamine E dans la prévention de l'athérosclérose dans les modèles animaux semblent évidents, alors que les études cliniques ont souvent révélé des résultats décevants ? (149) (150) (151). Un élément de réponse réside probablement dans l'homogénéité des échantillons étudiés. En effet, les études d'interventions menées sur des échantillons plus faibles présentaient de meilleurs résultats en raison d'une probable meilleure homogénéité en termes d'âge, de pathologies

associées, de sexe, et de régime alimentaire d'une part mais également en termes de patrimoine génétique, notamment concernant les polymorphismes de l'apolipoprotéine E et de l'haptoglobine. C'est pourquoi certains auteurs ont suggéré que des études ciblées sur les liens entre polymorphisme génétique et effet de la vitamine E pourraient conduire à une meilleure compréhension des divergences de résultat entre les études menées chez l'Homme et chez l'animal. Un autre élément de réponse réside dans les mécanismes même des phénomènes d'oxydation lipidique incriminés dans l'athérosclérose. En effet, il a été montré récemment que les LDL sont oxydés au sein même des lysosomes des macrophages (152), or il semblerait que la capacité d'inhibition des phénomènes d'oxydation de l' α -tocophérol soit diminuée au pH lysosomal (pH = 4,5) (153). Cette récente découverte pourrait expliquer les résultats cliniques décevants rapportés précédemment.

2. Système immunitaire, allergie et inflammation

Depuis quelques années, des études ont démontré que la supplémentation en vitamine E améliorerait les réponses immunitaires à médiation cellulaire et humorales chez différentes espèces animales. En effet, une augmentation de la prolifération lymphocytaire, des taux d'immunoglobuline et d'anticorps, de l'activité des lymphocytes NK (Natural Killer) et de la production d'interleukine (IL)-2 a été rapportée suite à une supplémentation en vitamine E (154) (155) (156) (157). Un certain nombre d'études interventionnelles ont également rapportés ces résultats mais en y associant une diminution de la production d'IL-6 en réponse à une supplémentation en vitamine E (158) (159) (160). De même, chez les individus souffrant d'allergie, on a observé une diminution de la réponse inflammatoire en réponse à l'exposition aux allergènes notamment au niveau des poumons, de la peau ou des intestins selon que les allergènes soient environnementaux ou alimentaires. Les différentes formes de vitamine E ont montré une capacité à réguler négativement le recrutement local des leucocytes en inhibant, les mécanismes d'adhésion cellulaires dépendant des protéines VCAM-1. Cette inhibition passe par une régulation de la transcription génique mais également par une inhibition directe du mécanisme d'action de VCAM-1. En effet, une fois activée, VCAM-1 recrute NOX2, le complexe catalytique membranaire de la NADPH-oxydase, qui génère alors des espèces réactives de d'oxygène qui, à leur tour, activent de façon transitoire la PKC α par oxydation (161). L'action

antioxydante des tocophérols s'oppose donc à ce mécanisme. Ce phénomène a été observé lors d'expériences *in vitro* dans lesquelles, l'incubation de cellules en présence d' α -tocophérol a bloqué la migration transendothéliale des lymphocytes et des éosinophiles (162). L' α -tocophérol semble donc s'opposer au déclenchement d'une réponse allergique et inflammatoire notamment au niveau pulmonaire, et l'idée de l'utiliser comme traitement préventif dans certaines allergies a d'ores et déjà été évoquée (100).

Un autre bienfait d'une supplémentation en vitamine E est le renforcement du système immunitaire notamment chez les personnes âgées. La supplémentation en vitamine E augmente la prolifération de lymphocytes T, la production d'interleukine-2 (IL-2) et une diminution de la production de prostaglandine E2 par les macrophages tant dans les modèles animaux que humains (163).

E. VITAMINE E ET FONCTION NEUROLOGIQUE

Il est important de développer séparément les liens entre vitamine E et système nerveux, à cause du rôle majeur qu'elle joue dans le développement et le maintien de l'intégrité de celui-ci. Rôle si important que les carences profondes en vitamine E affectent préférentiellement ce dernier, et ce, de façon systématiquement dramatique en l'absence de prise en charge efficace.

1. Vitamine E et maintien de l'intégrité du système nerveux

Depuis une trentaine d'années, il est admis que la vitamine E joue un rôle majeur dans le maintien de la structure et de l'intégrité du système nerveux (164) (165). Ce rôle a d'abord été décrit chez l'animal lorsqu'il a été observé qu'une carence en vitamine E a entraîné une dégénérescence du système nerveux et du muscle squelettique dans différents modèles animaux. En effet, pour la première fois, en 1928, une paralysie a été remarquée chez des enfants allaités par des mères carencées en vitamine E. Plus tard, un régime pauvre en vitamine E a été incriminé dans le développement d'une encéphalomalacie et d'une ataxie observée chez des poussins (166) et dans le développement d'une dystrophie

musculaire chez des cochons et des rats (167). De même, soumis à un régime pauvre en vitamine E, des singes Rhésus ont présenté une dégénérescence neuro-axonale centrale et périphérique ainsi que des anomalies rétinienne et de nombreuses autres espèces animales ont montré des signes de myopathie squelettique et cardiaque. Suite à ces observations, à partir de 1962, les conséquences neurologiques d'une carence chronique en vitamine E a été plus particulièrement étudiée chez le rat. Pentschew *et al.* ont alors décrit une dégénérescence des axones afférents au niveau de la moëlle épinière, des noyaux graciles et cunéiformes de la voie lemniscale, du ganglion trigéminal et du tractus solitaire (168). Une dystrophie axonale a aussi été observée sur les nerfs sensitifs périphériques (169). L'idée qu'une carence en vitamine E peut causer des anomalies profondes du système nerveux a donc commencé à être admise. Quelques années plus tard, des dystrophies axonales de même type ont été décrites lors d'autopsie d'enfants et de jeunes adultes atteints d'atrésie biliaire congénital ou de mucoviscidose (170). Bien qu'à cette époque, les taux sériques en vitamine E de ces patients n'aient pas été mesurés, les auteurs avaient estimé très probable la carence en vitamine E car ces deux pathologies sont associées à un syndrome de malabsorption intestinale des lipides, ce qui inclut les vitamines liposolubles. C'est ainsi qu'en 1977, Muller *et al.* ont apporté les premières preuves irréfutables de lien entre carence en vitamine E et ataxie spinocérébelleuse chez des patients atteints d'abêtalipoprotéïnémie, une autre maladie génétique caractérisée par une malabsorption lipidique qui sera décrite ultérieurement (171). Des troubles neurologiques de même type apparaissent également chez les patients souffrant de stéatorrhées chroniques après résection chirurgicale dans le traitement de la maladie de Crohn, chez les patients souffrant de pseudo-obstruction intestinale (172) ou de thrombose vasculaire mésentérique (173). Toutes ces pathologies sont caractérisées par une malabsorption intestinale acquise des lipides qui conduit, en 10 à 20 ans à une carence symptomatique en vitamine E. Des anomalies de l'électrocardiogramme et une rétinopathie pigmentaire accompagnent les symptômes neurologiques. Finalement, le lien a définitivement été fait lors de la découverte de l'ataxie avec déficit isolé en vitamine E (AVED), une ataxie héréditaire rare et sévère entraînant une neurodégénérescence progressive des voies nerveuses allant du cervelet à la moëlle épinière (174). Le rôle de la vitamine E dans le maintien de l'intégrité du système nerveux a donc été reconnu et admis. La carence en vitamine E est généralement secondaire à une pathologie associée à des troubles de l'absorption intestinale telles que l'insuffisance pancréatique exocrine, la cholestase ou les hypocholestérolémies génétiques.

2. Vitamine E et Alzheimer

Depuis plusieurs années, l'idée que la vitamine E puisse être proposée comme traitement de la maladie d'Alzheimer commence à être admise. Cependant, son efficacité dans cette utilisation n'est pas claire. En effet, comme expliqué précédemment, la vitamine E possède effectivement des propriétés de neuroprotection ainsi que des propriétés anti-inflammatoires et hypocholestérolémiantes, ce qui en fait, a priori, un candidat idéal pour le maintien de l'intégrité de la fonction cérébral. De plus, il a d'ores et déjà été observé que les taux de vitamine E chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer sont inférieurs à ceux des témoins non déments (175).

D'un point de vue épidémiologique, une association positive entre supplémentation en vitamine E et diminution du risque de développer une maladie d'Alzheimer a également été mise en évidence. En effet, en 1998, une étude prospective portant sur 633 personnes a indiqué qu'aucun des 27 volontaires sains supplémenté en vitamine E n'ont développé de maladie d'Alzheimer après une période de suivi de 4,3 ans (176). En 2002, une étude néerlandaise a confirmé ce résultat grâce au suivi d'une cohorte pendant six ans (177). Une autre étude prospective, publiée la même année et menée entre 1993 et 2000, auprès de 815 personnes âgées de 65 ans et plus, initialement non déments, a suggéré que la consommation d'aliments riches en vitamine E pourrait être associée à une diminution du risque de développer une maladie d'Alzheimer (178). De même, une étude prospective américaine (Cache Country Study, Utah, USA), a conclu à une diminution significative du risque de maladie d'Alzheimer chez les personnes supplémentées en vitamine E et en compléments multivitaminiques contenant, entre autres, de la vitamine C (179). Finalement, les données d'une étude canadienne portant sur le vieillissement et la démence (1991-2002) menées sur 560 patients atteints de maladie d'Alzheimer, ont suggéré que l'utilisation de suppléments de vitamine E était associée à un déclin cognitif moindre (180).

Pour autant, trois autres études importantes n'ont montré aucune association entre l'apport en vitamine E et le risque de développer une maladie d'Alzheimer. La première étude, avec 2969 participants suivis tous les deux ans pendant 5,5 ans, a conclu que l'utilisation des compléments alimentaires riches en vitamine E et C, ne réduisait pas le risque de maladie d'Alzheimer ou de démence (181). La seconde étude (Asia Aging Study ;

Honolulu) menée sur 3385 Hommes, a révélé que les suppléments de vitamines E et C pouvaient améliorer les fonctions cognitives en fin de vie, mais qu'aucun effet protecteur n'avait été mis en évidence concernant la maladie d'Alzheimer (182). Enfin, la dernière étude (Washington Heights-Inwood Columbia Aging Project) portant sur 980 personnes âgées a révélé que ni la consommation d'aliments riches en vitamine E, ni la supplémentation n'était associée à une diminution du risque de maladie d'Alzheimer (183).

IV. LES HYPOCHOLESTEROLÉMIES PRIMAIRES INTESTINALES

Les hypocholestérolémies primaires forment un groupe hétérogène de pathologies caractérisées par des concentrations plasmatiques en cholestérol total, en LDL-cholestérol (LDL-C) et en apolipoprotéine B inférieures au 5ème percentile de la population pour l'âge et le sexe. Les hypocholestérolémies peuvent être liées à d'autres pathologies (cancers, hyperthyroïdie, insuffisance hépatique, dénutrition, inflammations chronique) et sont dites secondaires. Beaucoup plus rarement, elles sont dites primaires et sont liées à des mutations, récessives ou dominantes, sur des gènes impliqués dans le métabolisme des lipoprotéines.

Les hypocholestérolémies de transmission récessive sont représentées par deux pathologies : l'abêtalipoprotéïnémie (ABL, OMIM 200100) et la maladie de rétention des chylomicrons (CMRD, OMIM 246700). En opposition, l'hypobêtalipoprotéïnémie familiale (FHBL, OMIM 107730), l'hypobêtalipoprotéïnémie liée à des mutations du gène PCSK9 et l'hypolipidémie combinée familiale liée à des mutations du gène ANGPTL3 constituent le groupe des hypocholestérolémies de transmission dominante.

ABL, CMRD et FHBL sont regroupées sous le terme d'hypocholestérolémies génétiques intestinales car elles sont causées par des mutations sur des gènes nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme des lipides au niveau intestinal. Dans la suite de ce travail, seules l'abêtalipoprotéïnémie (ABL) et la maladie de rétention des chylomicrons (CMRD) seront développées car ce sont ces pathologies qui servent de modèles d'étude pour l'ensemble des hypocholestérolémies primaires. Ces troubles sont caractérisés par l'absence d'assemblage ou de sécrétion de lipoprotéines à apoB par le foie et / ou l'intestin. Bien que la FHBL ne soit pas détaillée, certains tableaux récapitulatifs en font mention afin de permettre une comparaison avec la CMRD et l'ABL pouvant servir à la compréhension du propos.

A. L'ABÉTALIPOPROTEINÉMIE (ABL)

1. Généralités

L'ABL, anciennement connue sous le nom de syndrome de Basen-Kornzweig (OMIM 200100), est une maladie autosomique récessive très rare, dont le premier cas a été rapporté en 1950 (184). La prévalence et l'incidence exacte sont inconnues, mais on estime que cette pathologie affecte moins d'une naissance sur un million dans la population générale, indépendamment du sexe et de la zone géographique (185). Une centaine de cas ont été décrits dont environ un tiers résulte de mariages consanguins. L'absence totale de lipoprotéines à apoB dans le plasma, qui caractérise l'ABL, est due à une mutation du gène MTP qui code pour la Microsomal Triglyceride Transfer Protein (NP_000244.2) (186), localisé chez l'Homme, sur le chromosome 4 entre les locus q22 et q24. Composé de 18 exons, ce gène a été découvert en 1992 et code pour une protéine de 894 acides aminés (187).

Comme évoqué précédemment, la MTP est essentielle pour la formation lipoprotéines à apoB intestinales (chylomicrons) et hépatiques (VLDL). Elle contribue à la stabilisation et de l'apoB à un stade précoce de sa synthèse et à sa lipidation. Si la MTP est absente, l'apoB n'est pas repliée correctement et elle se lie à une protéine cytosolique chaperonne, la protéine Hsp 70 (heat shock protein 70), qui va entraîner l'apoB vers la voie du protéasome, pour être dégradée après ubiquitinylation (188).

Parmi tous les cas recensés à ce jour, une cinquantaine de mutations différentes ont été décrites. La majorité présentait des mutations à l'état homozygote et moins d'un quart étaient hétérozygotes. Les mutations les plus fréquentes aboutissent à la formation de protéines tronquées, soit par apparition d'un codon stop prématuré (décalage du cadre de lecture ou mutation non-sens), soit par anomalie d'épissage. Les mutations faux sens (insertions ou délétions ponctuelles) sont rares et pourraient avoir des phénotypes moins graves.

2. Symptomatologie clinique

Le tableau clinique classique, décrit à l'origine par Bassen et Kornzweig est la conséquence d'une malabsorption intestinale des graisses alimentaires (189) avec diarrhée, stéatorrhée, retard de croissance, ataxie de Friedreich, neuropathie périphérique, rétinite pigmentaire et acanthocytose (187) (190) (186) (191).

a) Atteintes digestives et hépatiques

Cliniquement, la malabsorption intestinale des lipides se manifeste, dès la petite enfance, par un syndrome de malabsorption avec vomissements, diarrhée chronique, stéatorrhée et ballonnement abdominal. La malnutrition résultante entraîne un retard staturopondéral conséquent. De plus, du fait de la malabsorption lipidique, les taux plasmatiques de vitamine E et de bêta-carotène sont effondrés et non détectables, les taux de vitamine A et K sont diminués tandis que la carence en vitamine D semble plus rare.

L'élément clé du diagnostic est l'endoscopie digestive haute à jeun qui montre un aspect de gelée jaune à blanche des villosités intestinales, quasi pathognomonique des hypocholestérolémies génétiques, en raison de l'accumulation de lipides. Au niveau histologique, les entérocytes apparaissent clarifiés en raison de l'accumulation de larges vacuoles lipidiques (192). Il ne semble pas y avoir d'adaptation de l'intestin à surcharge lipidique. Ainsi, Les signes gastro-intestinaux peuvent régresser lors de l'instauration d'un régime pauvre en graisse mais les diarrhées reprennent dès l'introduction d'un régime standard même à l'âge adulte (193).

Cette stéatose, reflet de l'accumulation intracellulaire des lipides non assemblés en lipoprotéines, est également retrouvée dans le foie. On observe donc une hépatomégalie associée à une élévation des enzymes hépatiques (alanine amino transférase, spartate aminotransférase et/ou gamma glutamyl transpeptidase) (193). Des cas d'évolution fibrotique, voire cirrhotique, de ces lésions ont été décrits imposant même la transplantation hépatique. La surveillance des fonctions hépatiques de ces patients est donc indispensable et le bilan biologique doit être associé à de l'imagerie (194) (195) (193).

b) Atteintes neurologiques

Les atteintes neurologiques font la gravité de la maladie et dominent le tableau clinique. Elles sont la conséquence directe des carences vitaminiques sévères, notamment en vitamine E. Dans l'histoire naturelle de la maladie, elles apparaissent le plus souvent au cours de la première ou de la deuxième décennie et miment une maladie de Friedreich, témoignant d'une atteinte à la fois centrale et périphérique (196). On observe souvent, en premier lieu, la diminution, puis la perte des réflexes ostéotendineux. S'installent ensuite progressivement une atteinte de proprioception, un syndrome cérébelleux (dysmétrie, ataxie, diplégie spastique avec élargissement du polygone de sustentation) et une faiblesse musculaire (196). L'évolution clinique est variable, mais en l'absence de traitement précoce par forte dose de vitamine E, ces complications neurologiques constituent progressivement un handicap invalidant (197). Les études électrophysiologiques montrent que les symptômes observés sont liés à un défaut de conduction au niveau des fibres centrales et, de façon moindre, au niveau des fibres périphériques. Il semble, par ailleurs, que les anomalies des fonctions sensitives sont plus fréquentes que celles des fonctions motrices. L'atteinte musculaire peut être biologiquement détectée par l'augmentation des taux sériques des phosphocréatine kinases, de l'aldolase et des transaminases.

c) Atteintes ophtalmologiques

Les manifestations ophtalmologiques sont variables et certains patients peuvent rester asymptomatiques jusqu'à l'âge adulte. Les premiers signes sont l'altération de la vision de nuit et des couleurs, en lien avec la dégénérescence rétinienne évoluant vers une diminution globale de l'acuité visuelle voire la cécité (198). L'examen du fond d'œil révèle une rétinite pigmentaire atypique caractérisée par l'existence de petites taches irrégulières blanchâtres et brillantes, arrondies ou allongées, pouvant atteindre la région maculaire. Les mécanismes sous-jacents restent encore mal connus, mais en l'absence de supplémentation par fortes doses de vitamines, la dégénérescence rétinienne conduit souvent à la cécité, révélant le rôle crucial qu'elles jouent (199).

d) Atteintes hématologiques et signes associés

Les signes hématologiques sont constants et caractéristiques. Ainsi l'acanthocytose, qui désigne la déformation en spicules de la membrane des globules rouges, est un marqueur qui a initialement défini la maladie. La présence d'acanthocytes devient significative au-delà de 3 à 5% des globules rouges, or dans l'abêtalipoprotéïnémie, les acanthocytes représentent généralement entre 50 % à 70 % de la population érythrocytaire. On retrouve également une anémie, associée à des stigmates d'hémolyse, et des troubles de l'hémostase liés au déficit en facteurs de la coagulation vitamine K-dépendants. Les atteintes cardiaques semblent plus rares mais un cas d'un enfant de 10 ans décédé d'une cardiomyopathie a été rapporté (200).

e) Atteintes osseuses

Les signes osseux sont moins bien documentés mais il a été observé une déminéralisation osseuse et un retard d'âge osseux (201). Elle résulterait de la malabsorption, de la dénutrition et de la carence en vitamine D (202).

3. Caractéristiques biologiques

La première conséquence sur le plan biologique est évidemment une profonde perturbation du bilan lipidique. On observe ainsi, à jeun, un abaissement du cholestérol total (0,5 à 1,3 mmol/L) et du LDL-cholestérol. La concentration en triglycéride est le plus souvent inférieure à 0.2 mmol/L. La signature biologique de cette pathologie est l'impossibilité de détecter l'apoB plasmatique par les méthodes de dosage classiques. Ces déficits sont constitutionnels car, même après une épreuve de charge orale en graisses, les chylomicrons, l'apoB et les triglycérides n'augmentent pas. La seule population lipoprotéique présente dans le plasma est la fraction HDL contenant la totalité du cholestérol, bien que les taux circulants soient généralement diminués de moitié par rapport à la population générale. Les sujets hétérozygotes, notamment les parents des patients, ont des bilans lipidiques normaux (203). Outre les troubles du bilan lipidique, la malabsorption intestinale entraîne de fortes carences en vitamines liposolubles majoritairement responsables des atteintes énumérées ci-dessus. Ainsi les patients ABL souffrent de carences profondes en vitamine E (204) responsables des complications

invalidantes de cette pathologie. Concernant les autres vitamines liposolubles, les concentrations en vitamines A et D sont généralement diminuées mais pas effondrées. Les données concernant la vitamine K sont plus rares mais cette vitamine ne semble pas représenter l'enjeu principal de la prise en charge de l'ABL car le suivi se fait facilement grâce à l'INR.

B. LA MALADIE DE RÉTENTION DES CHYLOMICRONS (CMRD)

1. Généralités

La maladie de rétention des chylomicrons, aussi nommée Maladie d'Anderson (OMIM #246700), est une autre forme d'hypobêta lipoprotéïnémie primaires à transmission autosomique récessive, particulièrement rare. Comme évoqué pour l'abêta lipoprotéïnémie, une part importante des cas recensés est retrouvée dans les populations présentant une certaine consanguinité, du fait de la nécessité de réunir les deux allèles pathologiques. Cette maladie a été décrite pour la première fois par Charlotte Anderson en 1961 (205). La prévalence est également faible, la maladie affectant moins d'une naissance pour un million. À ce jour, deux cohortes principales, une française (201) et une canadienne (206) ont permis de décrire cette maladie. Ainsi, rétention intestinale des chylomicrons qui a donné son nom à la pathologie, est due à des mutations du gène SARA2 localisé sur le chromosome 5 sur le locus q31.1. Ce gène code pour une protéine de 198 acides aminés et essentielle au transport vésiculaire des chylomicrons dans l'entérocyte : la protéine Sar1b (NP_001028675.1) (207).

Comme décrit précédemment, la protéine Sar1 est une GTPase (Guanine tri-phosphatase) impliquée dans la formation des vésicules de type COPII, dans le réticulum endoplasmique en liant la protéine Sec12 (208). Ces vésicules de transport permettent le transfert des lipides alimentaires entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Le domaine G est essentiel à la fonction de Sar1, or, la majorité des mutations recensées semblent altérer le domaine de liaison au GTP, bloquant ainsi le mécanisme de transfert des lipides. La synthèse des chylomicrons étant conservée mais leur transport intracellulaire perturbé, l'expression clinique et biologique de la CMRD est moins sévère que celle de l'ABL. Il est important de noter que l'expression de cette pathologie est

quasi-exclusivement intestinale, ce qui semble inconsistant avec l'expression ubiquitaire et le rôle généraliste dans la formation vésicules COPII de la protéine Sar1b. Cette incohérence n'est pas encore comprise (209).

2. Symptomatologie clinique

Décrit pour la première fois par C. Anderson, le tableau clinique est, là aussi, directement lié à la malabsorption des lipides. Les symptômes sont relativement comparables à ceux observés dans la maladie cœliaque avec une stéatorrhée importante ainsi que des diarrhées et un retard de croissance (210).

a) Atteintes digestives et hépatiques

Cliniquement, le syndrome de malabsorption n'a rien de spécifique par rapport à l'ABL. L'intolérance aux graisses alimentaire est constante avec diarrhées, stéatorrhée, vomissement et distension abdominale dès la petite enfance. Ces symptômes disparaissent en quelques jours à quelques semaines lors d'un régime pauvre en triglycérides à longue chaîne (193). On observe également des carences en vitamines liposolubles avec des taux de carotène, de vitamines A et surtout de vitamine E sont fortement diminués. Des signes de carences en vitamine D peuvent également être retrouvés. En revanche, contrairement à la maladie cœliaque, l'examen endoscopique révèle un relief villositaire normal, ce qui permet de faire le diagnostic différentiel. On retrouve l'aspect de gelée blanchâtre au niveau de la muqueuse duodénale, jéjunale voire iléale. Au niveau de l'analyse histochimique ultrastructurale, on observe des entérocytes chargés en vacuoles lipidiques sous forme libre dans le cytoplasme, ou sous forme de particules ressemblant à des lipoprotéines (211). En effet, puisque les lipoprotéines sont formées mais ne peuvent être sécrétées, celle-ci s'accumulent. Le foie est généralement normal, mais une hépatomégalie peut apparaître avec élévation modérée des transaminases (193). Certains cas de stéatose ont été rapportés mais une évolution vers la cirrhose n'a, à ce jour, pas encore été constatée.

b) Atteintes neurologiques et ophtalmiques

A l'instar de l'abêtalipoprotéinémie, la carence en vitamine E est responsable d'une dégradation du système nerveux central et périphérique, bien que la fréquence d'apparition des signes neuro-ophtalmiques semble retardée dans la CMRD avec une évolution moins sévère. Cependant, en l'absence de traitement, on observe tout de même une perte des réflexes achilléens vers cinq ans, suivi d'une démyélinisation périphérique et centrale responsable d'une perte progressive de la proprioception et du développement d'une ataxie entre 10 et 20 ans (212). Ces signes cliniques sont généralement précédés par une diminution des potentiels d'action sensoriels observables à l'électromyogramme.

Les atteintes oculaires de le CMRD sont plus modérées mais une dégénérescence rétinienne pigmentaire est décelable très précocement au rétinogramme (213). Cette destruction progressive de la rétine évolue généralement, en l'absence de prise en charge (214), vers une perte de l'acuité visuelle nocturne et, dans de rares cas, vers une cécité. On observe également un micro nystagmus et une perte progressive de la vision des couleurs de l'axe bleu-jaune (198).

c) Atteintes hématologiques, cardiaques et musculaires

A l'inverse de l'abêtalipoprotéinémie, l'acanthocytose est rare voire absente (215). Cependant, des manifestations extra-intestinales ont été rapportées, ce qui peut s'expliquer par l'expression ubiquitaire de la protéine Sar1b. Ainsi, une myopathie primitive peut se développer avec anomalie des fibres musculaires et augmentation des créatines kinases entraînant une faiblesse musculaire globale. Une anomalie cardiaque a été détectée de façon relativement rare et isolée (216).

3. Caractéristiques biologiques

Le bilan lipidique est évidemment perturbé mais de façon moins sévère que dans l'abêtalipoprotéinémie. Ainsi, chez les patients à jeun, les taux de cholestérol total sont diminués mais non effondrés, restant généralement supérieurs à 1,3 mmol/L. Les taux de LDL-cholestérol, de phospholipides, de triglycérides sont également bas. L'apoB-48 est absente tandis que les lipoprotéines à apoB-100 (LDL et VLDL) sont détectables mais

diminuées (217) (218). Les taux d'HDL-cholestérol et d'ApoA1 sont diminués de moitié. Après épreuve orale de charge en lipides, les taux de chylomicrons (donc de triglycérides) et d'apoB-48 n'augmentent pas, ce qui est un élément essentiel à l'établissement du diagnostic (206). De façon moins impressionnante que dans l'ABL, les taux de vitamines liposolubles sont fortement diminués et ce, encore une fois, de manière plus importante pour la vitamine E (178). Cette dernière carence représente réellement l'enjeu majeur de ces pathologies puisque responsable des complications majeures.

C. L'HYPOBËTALIPOPROTÉINEMIE FAMILIALE

L'hypobêtalipoprotéinémie familiale, de transmission codominante (FHBL) ne fait pas directement l'objet de la mise en place d'un modèle d'étude car la symptomatologie clinique, les caractéristiques biologique et les modalités thérapeutiques de cette pathologie sont assimilables à l'abêtalipoprotéinémie. Ainsi, un modèle d'étude d'ABL permet également d'étudier la FHBL. C'est pourquoi il est, malgré tout, intéressant d'avoir quelques connaissances sur cette pathologie.

La FHBL (OMIM #615558) est donc une maladie génétique avec une prévalence extrêmement faible d'environ 1 pour 1 000 000. Elle est causée par des mutations du gène APOB, situé sur le chromosome 2 en position 2p24.1, dont la majorité conduisent à l'insertion d'un codon stop et à la synthèse d'une protéine tronquée (199). Ainsi, tout comme l'ABL, cette pathologie se caractérise par des concentrations plasmatiques en Apolipoprotéine B et en cholestérol total inférieures au 5^e percentile de la population et un taux de LDL-cholestérol très faible, entre 0.5 et 1.3 mmol/L (219).

Nous avons déjà discuté de l'importance de l'apolipoprotéine B dans le métabolisme des lipides et des vitamines liposolubles, il n'est donc pas étonnant de constater qu'en l'absence de prise en charge, les conséquences physiopathologiques de la FHBL soient similaires à celles observées dans l'ABL. Ainsi, on retrouve des patients souffrants, dès leur plus jeune âge, d'une malabsorption intestinale des lipides associée à des vomissements, une diarrhée chronique et une stéatorrhée. Ces symptômes sont responsables d'une malnutrition évidente à l'origine du retard staturo-pondéral caractéristique de ces pathologies (220). Là encore, on retrouve une paroi intestinale et des cellules hépatiques et intestinales surchargées en lipides entraînant le développement d'une hépatomégalie associée à une élévation des enzymes hépatiques (221). On retrouve

également les atteintes neurologiques et ophtalmologiques à l'origine de l'importance d'un diagnostic et d'une prise en charge précoce, notamment par supplémentation en vitamine E. On observe ainsi, un dysfonctionnement cérébelleux sous forme d'ataxie et de dysmétrie, associé à une démyélinisation des axones spinocérébelleux entraînant perte de la proprioception et des réflexes tendineux mais également une diminution de la fonction visuelle et une rétinite pigmentaire (199). Enfin, on note toujours la présence d'une acanthocytose associée à une anémie et à des troubles de l'hémostase. Les atteintes osseuses retrouvées dans l'ABL n'ont pas été décrites dans la FHBL mais il n'est pas exclu qu'elles puissent exister (199).

Concernant le bilan biologique, il n'existe aucune différence entre l'ABL et la FHBL. On décrit donc une perturbation du bilan lipidique avec effondrement des taux de cholestérol, de triglycérides, d'apoB et de profondes carences en vitamines liposolubles.

Les symptômes cliniques et biologiques des hypobétalipoprotéïnémies sont résumés dans le tableau 5 ci-dessous.

	CMRD	ABL	FHBL
Diarrhée	+++	+++	+++
Stéatorrhée	++	+++	+++
Retard staturo-pondéral	+++	+++	+++
Complications :			
- Rétinopathie	+	+++	+++
- Myopathie	+	+++	+++
- Neuropathie	+	+++	+++
- Cardiomyopathie	±	++	++
- Stéatose hépatique	+	++	++
Bilan lipidique (médiane) :			
- Cholestérol total	1.8	0.9	0,88
- LDL	0.8	<0.04	0,23
- HDL	0.5	0.7	0,06
- TG	0.8	0.09	0,77
- ApoB (g/L)	0.4	<0.02	<0,02
Acanthocytes		>50%	-

Anomalies cliniques : +++ = très fréquentes ; ++ = fréquentes ; ± = inconstantes, - = rares

Tableau 5. Fréquence des symptômes cliniques et profil lipidique des patients ABL, FHBL et CMRD selon Peretti et al., (2010) et Burnett et al., (2012)

D. PRISE EN CHARGE THÉRAPEUTIQUE DES HYPOCHOLESTEROLÉMIES PRIMAIRES INTESTINALES

Une prise en charge précoce est essentielle pour limiter l'ensemble des complications liées à la malabsorption lipidique chronique et à la carence en vitamines liposolubles. Les recommandations de prise en charge ont été mises à jour en 2010 et 2014 par Peretti et al. (193), ainsi que Lee, J. et al, (199), respectivement. Le traitement est essentiellement basé sur une prise en charge diététique imposant l'instauration d'un régime pauvre en graisse (moins de 30% de l'apport calorique total) contenant une quantité suffisante d'acides gras essentiels (3 à 5% du total des calories en ω -6 et 0,5 à 1% en ω -3) associée à une supplémentation en vitamines liposolubles. L'apport quotidien en acides gras essentiels (ω 3 et ω 6) se fait sous forme d'huiles végétales (huile d'olive ou de soja), de l'ordre de 2 à 4 cuillères à café par jour chez le très jeune enfant et 5 à 10 cuillères à café par jour chez l'adolescent. Chez les très jeunes enfants, les préparations à base de lait à chaîne moyenne permettent d'améliorer le confort digestif et de corriger la malnutrition en quelques jours. Chez les enfants plus âgés, un régime pauvre en acides gras à longue chaîne suffit généralement à atténuer les signes d'intolérance digestive (193).

La supplémentation en vitamines liposolubles représente l'enjeu majeur du traitement symptomatologique de ces maladies et se doit d'être efficace et suivi pour prévenir l'apparition des lésions neurologiques et rétinienne. Ainsi, le traitement est basé sur une supplémentation orale à fortes doses en vitamine E (100 à 300 UI/kg/24h) et en vitamine A (10 000 à 20 000 UI/24h), notamment pour les patients ABL chez qui les complications tendent à être plus sévères. Chez les patients CMRD, la dose de vitamine E est généralement moindre puisqu'une supplémentation de 50 UI/kg/24h semble nécessaire et suffisante (222) (223) (193). La supplémentation orale en vitamine E se fait sous forme d'acétate de RRR- α -tocophérol pour palier à sélectivité élevée du tissu nerveux et conserver le motif phénol (224) et ne semble pas présenter de problème en terme de toxicité et de sécurité. En revanche, du fait d'un cas de toxicité de la vitamine A rapporté dans la littérature (225) et de sa tératogénicité, une surveillance particulière doit être accordée au dosage plasmatique des carotènes, notamment chez les femmes en âge de procréer. Une supplémentation en vitamine D (800 à 1200 UI/24h), instaurée tôt, permet de prévenir le développement d'une ostéopénie et l'administration de 15 mg/semaine de vitamine K est nécessaire pour maintenir des fonctions normales de coagulation et d'hémostase sans

risque d'hémorragie. La dose se doit, cependant, d'être ajustée en fonction de l'INR (193). Le protocole de supplémentation est résumé dans le tableau 6 ci-dessous.

Il est important de noter que la supplémentation en vitamines se fait par voie orale car il est admis que de fortes doses de vitamines liposolubles permettent une absorption par voie portale et possiblement par incorporation dans des particules de HDL, dont le métabolisme n'est pas, a priori, impacté par les mutations.

	CMRD	ABL	FHBL
Vitamine E	50 UI/kg/24h	100 à 300 UI/kg/24h	100 à 300 UI/kg/24h
Vitamine A	15 000 UI/24h	100 à 400 UI/kg/24h	100 à 400 UI/kg/24h
Vitamine D	800 à 1200 UI/kg/24h ou 100 000 UI/2 mois (si < 5 ans)	800 à 1200 UI/kg/24h	800 à 1200 UI/kg/24h
Vitamine K	15 mg/semaine (à ajuster à l'INR ou à la concentration)	5 à 35 mg/semaine (à ajuster à l'INR ou à la concentration)	5 à 35 mg/semaine (à ajuster à l'INR ou à la concentration)

Tableau 6. *Recommandations pour la supplémentation vitaminique orale des patients atteints d'hypocholestérolémies génétiques (d'après Levy, 2015 et Peretti et al., 2010)*

Le suivi se fait, tous les ans avec un examen clinique et une évaluation biologique de la croissance et des éventuelles complications gastro-intestinales, hépatiques et neurologiques. A partir de 10 ans, une surveillance des fonctions neurologiques et ophtalmologiques est effectuée tous les trois ans. Un échocardiogramme peut être éventuellement envisagé à l'âge adulte.

Concernant le pronostic, celui-ci est bon dès lors que les recommandations diététiques sont correctement suivies et que la supplémentation vitaminique est maintenue et surveillée. Ainsi, les patients traités ont une espérance de vie d'au moins soixante ans. De plus, les patients ne semblent pas soulever de problématiques concernant la vie sexuelle et des cas de grossesses réussies ont été rapportées (226) (227) (213). Cependant, malgré une supplémentation vitaminique strictement suivie, de nombreux cas de dégénérescences rétiniennes ont été observés et les taux plasmatiques de vitamine E ne sont jamais rétablis (225) (198).

V. ENJEUX DE CE TRAVAIL

Comme il a été montré tout au long de l'introduction bibliographique, les hypocholestérolémies génétiques sont des pathologies rares et complexes pour lesquelles la prise en charge vise à prévenir ou corriger les complications en particulier sur le plan neurologique et ophtalmologique. Ces complications sont principalement dues à une carence en vitamine E dont le rôle ubiquitaire fondamental a également été démontré précédemment. Ces carences sont directement liées au métabolisme de cette molécule particulièrement lipophile, dépendant des lipoprotéines à ApoB que sont les chylomicrons et les VLDL. Les anomalies mises en jeu dans ces pathologies imposent aux patients un régime strict associé à une supplémentation par de très fortes doses de vitamine E. Or, malgré ces supplémentations, seules les concentrations plasmatiques en vitamine E (parmi les 4 vitamines liposolubles) ne sont jamais restaurées et ce, malgré l'utilisation de formulations hydrosoluble de cette dernière.

Afin de comprendre cette incapacité à restaurer les taux plasmatiques en vitamine E, il est essentiel d'en comprendre son métabolisme intra-entérocytaire qui reste, à ce jour, peu étudié. C'est pourquoi, dans la suite de ce travail, une étude de l'absorption de la vitamine E a été effectuée sur deux modèles expérimentaux. Une première étude sur un modèle murin a permis de confirmer les problématiques soulevées dans ces pathologies et a permis de mettre en évidence des paradoxes quant à l'absorption de la vitamine E au niveau entérocytaire. C'est pourquoi, il est devenu essentiel de créer un modèle cellulaire d'abêtalipoprotéïnémie et de maladie de rétention des chylomicrons, sur cellule d'adénocarcinome de colon humain afin d'étudier, au niveau intra-enterocytaire, le métabolisme de cette vitamine si particulière et ainsi ouvrir possiblement ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour ces patients.

VI. CRÉATION DU MODÈLE D'ÉTUDE D'ABSORPTION DE LA VITAMINE E DANS LES HYPOCHOLESTEROLÉMIES PRIMAIRES INTESTINALES

A. MATÉRIEL ET MÉTHODE

Matériel et produits

Le milieu de culture (Dulbecco's modified Eagle's medium ou DMEM) contenant 4,5 g/L de glucose et un mélange trypsine-EDTA, les acides aminés non essentiels, le mélange pénicilline / streptomycine ainsi que le PBS ont été achetés chez Life Technologies (Illkirch, France). Le sérum de veau fœtal (SVF) a été fourni par PAA (Vélizy Villacoublay, France). Les amorces d'ADN, les ARN (tracrRNA et crRNA), la protéine Cas9 et les enzymes de digestion ont été achetés chez Invitrogen (Waltham, Massachusetts, États-Unis). L'alpha-tocophérol, le gamma-tocophérol et le rétinyl-acétate proviennent de Sigma (St Quantin-Fallavier, France). Tous les solvants utilisés en HPLC ont été fournis par SDS (Peypin, France).

Expérimentation animale

Les souris *Mttp*-KO au niveau intestinal ont été fournies par Davidson et al de la Washington University School of Medicine. Le protocole d'expérience a été approuvé par le comité d'éthique du centre de recherche sur les maladies digestives de la faculté de médecine de l'Université de Washington (Digestive Disease Research Core Center, Washington University School of Medicine). Le statut lipidique et le statut en vitamine E a été évalué à partir de deux groupes de souris composé de six souris contrôle (WT) et de six souris déficientes en MTTP au niveau intestinal (*Mttp*-iKo). Les souris ont été anesthésiées au sevoflurane pour permettre le prélèvement des échantillons sanguins puis euthanasiées par dislocation manuelle des cervicales pour permettre le prélèvement des organes. Les globules rouges ont été isolés du plasma selon le protocole de Cuerq et al. (228). Les échantillons de foie, de tissu adipeux, de duodénum, de jéjunum (proximal,

médian et distal) et d'iléon ont conservés dans l'azote liquide puis à -80°C jusqu'à l'analyse de la vitamine E et des lipides.

Culture cellulaire

Toutes les lignées cellulaires Caco-2/TC7 mutées ont été cultivées dans du DMEM contenant 8% de SVF, 1% de pénicilline-streptomycine et 1% d'acides aminés non essentiels à 37°C dans une atmosphère à 10% de CO₂. La lignée mère non mutée a été cultivée dans du DMEM contenant 16% de SVF, 1% de pénicilline-streptomycine et 1% d'acides aminés non essentiels à 37°C dans une atmosphère à 10% de CO₂.

Design des ARN guide pour la transfection et des amorces génomiques pour la PCR

Les gènes SAR1B et MTTP ont été invalidés dans les cellules Caco-2/TC7 grâce au système d'édition du génome « CRISPR / Cas9 » à l'aide d'un ARN guide conçu par Invitrogen (5791, Van Allen Way, Carlsbad, Californie 92008, États-Unis) et produit par Synthego (Redwood City, Californie 64063 États-Unis). Les séquences reçues au laboratoire étaient les suivantes :

- MTTP n°004 (5'-ACGCUCCUUCAUCUAAUCCA-3'),
- MTTP n°005 (5'-UACACGGCCAUUCCCAUUGU-3'),
- SAR1B n°414 (5'-UUGACUCU AACAGCCUUUCG-3')
- SAR1B n°418 (5'-UCCGAAGAACUGUGUGC-3').

Les amorces génomiques ont été choisies pour amplifier par PCR un fragment de 484 paires de bases pour le gène MTTP et de 475 paires de bases pour le gène SAR1B. Elles ont été conçues par Invitrogen (5791, Van Allen Way, Carlsbad, Californie 92008, États-Unis) de la façon suivante :

- MTTP sens (5'-AAAGTGAGTGGCAAGGTCCT-3'),
- MTTP antisens (5'-GGGAACTCAGGGCATTGATTC-3'),
- SAR1B sens (5'-AAGTACCAGCAGCTAAGGGA-3')
- SAR1B antisens (5'-ACATTCTGTACAGGGTGAGCT-3').

Vérification des amorces génomiques

La spécificité des amorces génomiques produites par Invitrogen (5791 Allen Way Carlsbad, Californie 92008, USA), a été vérifiée par PCR. Ce test a été effectué en utilisant 2 µL d'ADN commercial mélangés à 25 µL d'AmpliTaq® Gold 360 Master Mix

en présence de 100 ng d'amorces sens et antisens. L'amplification a été réalisée en 40 cycles (30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 55°C et 30 secondes d'élongation à 72°C) après 10 min de dénaturation à 95°C. L'extension finale s'est faite en 7 minutes à 72°C. Les produits d'amplification ont été détectés par électrophorèse sur un gel d'agarose E-gel à 1 % avec bromure d'éthidium.

Détermination de la confluence optimale pour la transfection

Afin d'établir les conditions optimales pour la transfection, les cellules ont été comptées et ensemencées en plaques 24 de façon à atteindre différentes confluences (de 30% à 50%). Les cellules ont ensuite été lipotransfectées en utilisant la lipofectamine «CRISPRMAX®» selon le protocole proposé par Invitrogen (publication N ° MAN0014545 Rév. B.0). Ce test a été réalisé avec l'ARN guide conçu par Invitrogen (5791 Van Allen Way, Carlsbad, Californie 92008, États-Unis) pour cibler le gène domestique HPRT1 (5'-GCAUUUCUCUGUCCUAAACA-3') considéré comme contrôle positif. Les cellules ont été transfectées comme décrit ci-dessus.

Transfection cellulaire par le système «CRISPRMAX®»

La veille de la transfection, les cellules adhérentes (cultivées en flasques T25) ont été traitées à la trypsine et récupérées dans 20 ml de milieu DMEM. Elles ont ensuite été réensemencées en plaques 24 puits par dépôt, dans chaque puit, de 300 µL du milieu contenant les cellules et 200 µL de milieu DMEM stérile afin que les cellules atteignent 30% de confluence au moment de la transfection. Le jour de la transfection, un premier mélange de 18,85 µL de milieu « Opti-MEM » (Gibco Opti-MEM I Reduced Serum Media), de 1,25 µL de protéine Cas9 et de 240 ng d'ARN guide (tracrRNA complexé au crRNA) a été préparé en tube Eppendorf stérile. Après homogénéisation par agitation au vortex, 2,5 µL de réactif Cas9 Plus ont été ajoutés et le mélange réactionnel final a été mis à incuber 1 minute à température ambiante. En parallèle, un mélange de 23,5 µL de milieu Opti-MEM et 1,5 µL de Lipofectamine «CRISPRMAX®» a été préparé en tube Eppendorf stérile. Après agitation au vortex et incubation (1 minute à température ambiante), la solution de Lipofectamine «CRISPRMAX®» a été ajoutée au mélange réactionnel contenant la protéine Cas9. La Lipofectamine «CRISPRMAX®» et la protéine Cas9 ont été laissées en contact pendant 12 minutes à température ambiante pour permettre la formation des complexes Cas9/lipofectamine «CRISPRMAX®». Ces complexes ont ensuite été déposés sur les cellules pour 48 heures. Après la transfection,

les cellules ont été récupérées et l'efficacité de la transfection a été vérifiée grâce au kit « GeneArt® Genomic Cleavage Detection ».

Dilution limite des cellules

Après avoir été transfectées en plaques 24 puits, les cellules ont été comptées et diluées à la concentration de 0,8 cellule/puits et réensemencées en plaques 96 puits pour permettre d'isoler et de caractériser chaque clone obtenu.

Purification de l'ADN

L'ADN génomique a été purifié en utilisant le kit « PureLink® Genomic DNA » selon les instructions fournies par le fabricant. Après avoir été ensemencées en boîte de Pétri pour atteindre 80% de confluence, les cellules ont été lavées au PBS froid et traitées à la trypsine puis récupérées en tube Falcon. Après 5 minutes de centrifugation à 250 g le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu dans 200 µL de PBS. Dans chaque échantillon, 20 µL de protéinase K (fournie avec le kit), 20 µL de RNase A (fournie avec le kit) et 200 µL de tampon PureLink® Genomic Lysis/Binding (fourni avec le kit) ont été ajoutés. Après agitation au vortex, les enzymes de digestion ont agi 10 minutes à 55°C. Après digestion, 200 µL d'éthanol pur ont été ajoutés au lysat. Après homogénéisation, les lysats (environ 640 µL) ont été déposés dans des colonnes « PureLink® Spin Column » et centrifugés 1 minute à 10 000 g à température ambiante. Après élimination du mélange réactionnel, 500 µL de tampon de lavage (préparé à l'éthanol selon le protocole du fabricant) ont été ajoutés et les colonnes ont été mises à centrifuger pendant 1 minute à 10 000 g à température ambiante. L'étape de lavage a été répétée une deuxième fois en utilisant le deuxième tampon de lavage fourni dans le kit. Après élimination du tampon de lavage, les colonnes ont été placées dans des tubes de stériles de 1,5 mL et l'ADN a été élué dans 100 µL de tampon d'éluion « PureLink® Genomic » par centrifugation (Pendant 1,5 minute à 10 000 g et à température ambiante) après une minute d'incubation à température ambiante. Les tubes stériles contenant l'ADN purifié ont été stockés à -20°C.

« Genomic cleavage assay »

L'efficacité de la transfection a été évaluée par le kit « GeneArt® Genomic Cleavage Detection » selon les instructions fournies par le fabricant. Le test a été effectué sur le gène domestique HPRT1 (5'-GCAUUUCUCUGUCCUAAACA-3') considéré comme

contrôle positif. Après la transfection (48h), les cellules ont été lavées avec du DPBS puis lysées avec 50 µL de tampon de lyse cellulaire par puits. Les cellules ont été récupérées en tubes Eppendorf et traitées à la protéinase K pendant 15 minutes à 68°C puis maintenues à 95°C pendant 10 minutes. Ensuite, 2 µL de lysat cellulaire ont été utilisés pour l'amplification réalisée grâce au kit AmpliTaq® Gold 360 Master Mix en présence des amorces sens (5'-ACATCAGCAGCTGTTCTG-3') et antisens (5'-GGCTGAAAGGAGAGAAG-3') correspondantes. L'amplification a été réalisée en 40 cycles (30 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 55°C et 30 secondes d'élongation à 72°C) après 10 min de dénaturation à 95°C. L'extension finale s'est faite en 7 minutes à 72°C. Les produits d'amplification (2 µL) ont été mélangés à 1 µL de « Detection Reaction Buffer 10x » (fourni dans le kit) et 6 µL d'eau ultra pure, avant de subir une étape de dénaturation et de réhybridation pendant 5 minutes à 95°C pendant 5 minutes. Les produits finaux ont été refroidis jusqu'à 85°C en 10 minutes, et laissés en chambre froide à 4°C pendant 16 heures. Le lendemain, 1 µL d'enzyme de détection a été ajouté à chaque échantillon et a agi pendant 1 heure à 37°C. Les produits de digestion ont été analysés et détectés par électrophorèse sur un gel d'agarose E-gel à 2% avec bromure d'éthidium. L'efficacité de la transfection a été déterminée en calculant le pourcentage de clivage selon la formule donnée par le fabricant :

$$\% \text{ de cellules transfectées} = 1 - ((\text{fraction d'ADN clivé})^{1/2})$$

Séquençage

Le séquençage de l'ADN génomique a été réalisé par Genoscreen (Lilles, France) par la méthode de Sanger.

Analyses par Western-Blot

Après avoir été cultivées en flasques T25 pendant 21 jours (14 jours après confluence), les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et récupérées par grattage dans 2 ml de PBS contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases (dilution de 1 : 200) dans des tubes Eppendorf stériles. Chaque échantillon a ensuite été vortexé pendant 15 minutes tout en étant maintenu à une température de 4°C. Après avoir été soniquées 15 minutes dans la glace, les lysats cellulaires ont été centrifugés pendant 5 minutes à 1200 rpm. Les surnageants ont été récupérés et quantifiés par le kit « BCA protein assay kit » (ThermoFisher Scientific ref kit). Une même quantité de protéines (20 µg pour MTTP et 30 µg pour Sar1b) ont été séparés par SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF.

Après 45 minutes de saturation dans une solution de lait à 10%, les membranes ont été mises en contact avec l'anticorps primaire spécifique de chaque protéine d'intérêt dilué au 1/500^e (Sar1B (AT1C7) : sc-517425 et MTP (C-1) : sc-515742 ; Santa Cruz Biotechnology, INC., CA, USA) une nuit entière à 4°C. Après avoir été lavées trois fois avec du TBST, les membranes ont été mises en contact avec un anticorps secondaire conjugués à la peroxydase de raifort (1 : 10000) à température ambiante pendant 1 heure. Les protéines ont été détectées par chimioluminescence.

Coloration par le « Oil Red O »

Plusieurs lignées de cellules transfectées ont été sélectionnées et colorées au « Oil Red O ». La solution « Oil Red O » a été préparée à partir d'une solution d'isopropanol saturée en « Oil Red O » (Sigma réf: O0625-25g[1320-06-5]) diluée dans de l'eau (2:3 v/v). Les cellules ont été fixées dans les puits de culture par incubation pendant 15 minutes avec une solution aqueuse à 10% d'acide acétique et 10% de méthanol. Après deux lavages à l'eau distillée, le colorant a été déposé sur les cellules et laissé en contact pendant 10 minutes. Le surplus de colorant a été aspiré et l'absorbance à 492 nm a été mesurée avant et après la coloration et les cellules ont été observées au microscope.

Expériences d'absorption avec la vitamine E

Afin d'apporter l' α -tocophérol aux cellules, des micelles ont été préparées selon le protocole de Reboul et *al.* Avec comme concentrations finales : 0,04 mM de phosphatidylcholine, 0,16 mM de lyso-phosphatidylcholine, 0,3 mM de mono-oléine, 0,1 mM de cholestérol, 0,5 mM d'acide oléique, 50 μ M d' α -tocophérol et 5 mM de taurocholate.

Les lignées cellulaires ont été cultivées en plaques 12 puits sur membrane semi-perméable pendant 15 jours.

Douze heures avant chaque expérience, les cellules ont été mises à jeun par apport, en apical et en basolatéral, d'un milieu complet sans sérum. Au début de chaque expérience, les micelles riches en tocophérol ont été déposées dans le milieu apical, tandis que le milieu basolatéral a été renouvelé avec du milieu complet sans sérum. Après 24 heures d'incubation à 37°C le milieu apical et le milieu basolatéral ont été récupérés en tube Eppendorf. Les cellules ont été lavées deux fois avec 0,5 ml de PBS froid puis grattées et

récupérées dans 0,5 ml de PBS. Les échantillons ont été stockés à -80°C jusqu'à l'analyse de la vitamine E et des lipides.

Préparation des échantillons pour les extractions

Les cellules ont été lavées avec du PBS et mises en suspension dans 100 µl de PBS. Les organes de souris ont été broyés dans du PBS (préparé avec 100 mg de PBS en poudre dissous dans 900 ml d'eau) avec des billes de métal à l'aide d'un broyeur Retsch.

Dosage des lipides

L'extraction des lipides a été réalisée selon la méthode « Bligh & Dyer ». Dans tous les échantillons (100 µl de lysat cellulaire ou 200 µl de broyat d'organes), 1 ml de méthanol et 0,5 ml de chloroforme ont été ajoutés. Après 2 minutes d'agitation au vortex, 0,5 ml d'eau et 0,5 ml de chloroforme ont été ajoutés. Tous les tubes ont été agités pendant 10 minutes puis centrifugés (2500 tr/min) 10 minutes à 4°C. La phase inférieure a été recueillie à l'aide d'une pipette pasteur et évaporée sous azote. Les extraits secs ont été repris dans 100 µl d'isopropanol. Les dosages de triglycérides, de phospholipides et de cholestérol ont été réalisés à l'aide du kit colorimétrique de BIOLABO (méthode de Fossati et Prencipe couplé à une réaction de Trinder). Sur une plaque 96 puits, 200 µl de réactif et 10 µl d'échantillons ont été déposés dans chaque puit et les résultats ont été obtenus à l'aide d'un lecteur de plaque iEMS labsystems.

Dosage de la vitamine E

L' α -tocophérol a été récupéré par extraction liquide-liquide en phase hexanique. Ainsi, de l'eau distillée a été ajoutée dans chaque échantillon pour atteindre un volume final de 500 µL par échantillon. A ce volume, 500 µl d'éthanol contenant un étalon interne en quantité connue (rétinyl-acétate ou gamma-tocophérol) et 1 ml d'hexane ont été ajoutés. Après 5 minutes d'agitation au vortex, les échantillons ont été centrifugés (2500 rpm) 10 minutes à 4°C. La phase supérieure (phase hexanique) a été récupérée dans un tube à hémolyse et évaporée sous azote. L'extrait sec a été repris dans 200 µl de méthanol (échantillons cellulaires) ou d'isopropanol (broyats d'organes). Un volume de 20 à 200 µL a été utilisé pour l'analyse HPLC.

Tous les échantillons ont été analysés par HPLC à 292 nm en utilisant un système Summit Dionex (Thermo FisherScientific) et le logiciel Chromeleon (version 6.80; Thermo FisherScientific). La séparation s'est faite en phase inverse sur une colonne

Adsorbosphere HS C₁₈ de 3 mm de diamètre (Interchim) maintenue à 37 ° C. La récupération des molécules s'est faite soit par élution avec un gradient de méthanol-acétonitrile (100/0 jusqu'à 40/60, v/v) soit par élution isocrastique de méthanol pur. La détection s'est faite grâce à un détecteur UV-visible et un détecteur fluorimétrique en série relié à un système d'intégration. La quantification a été faite à l'aide logiciel Chromeleon (version 6.50 SP4 Build 1000) en comparant l'aire des pics de chaque échantillon avec les courbes d'étalonnage externes.

Statistiques

Les analyses statistiques ont été faites sur le logiciel GraphPad Prism version 8.4.3 (GraphPad Software LLC, San Diego, CA 92108, USA) en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney avec un risque d'erreur fixé à 5%. Les différences ont été considérées comme étant significatives pour des valeurs de $p < 0,05$.

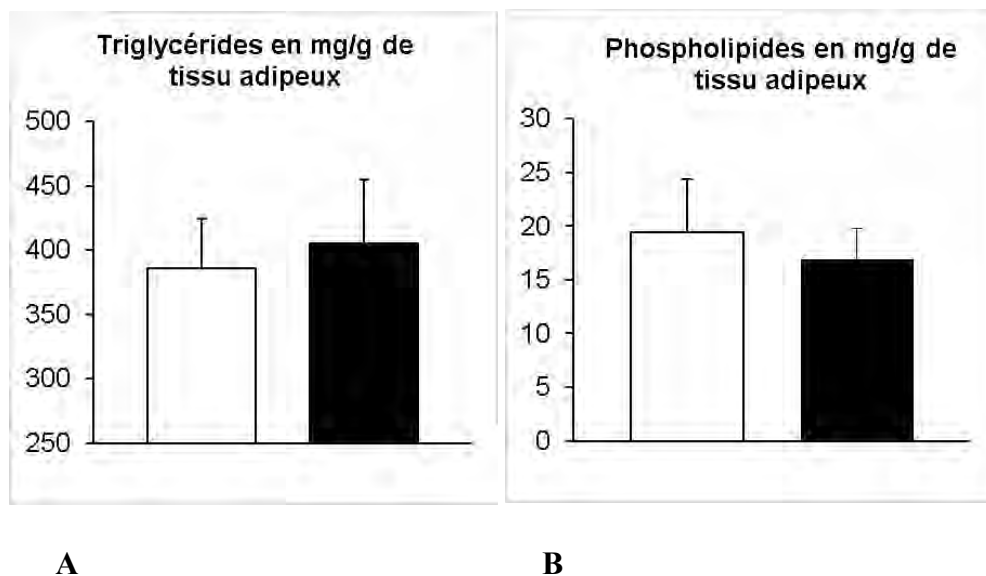
B. RÉSULTATS

1. Modèle de souris *Mttp-iKO*

Tout d'abord, un modèle de souris a été créé et étudié afin de préciser les problématiques rencontrées dans les hypocholestérolémies primaires intestinales.

a) Résultats des statuts lipidiques

Les résultats des analyses lipidiques (figure 9) ne montrent aucune différence significative concernant le taux de lipides dans le tissu adipeux entre les souris contrôles et les souris *Mttp-iKo*, et ce, quel que soit la catégorie de lipides considérée.



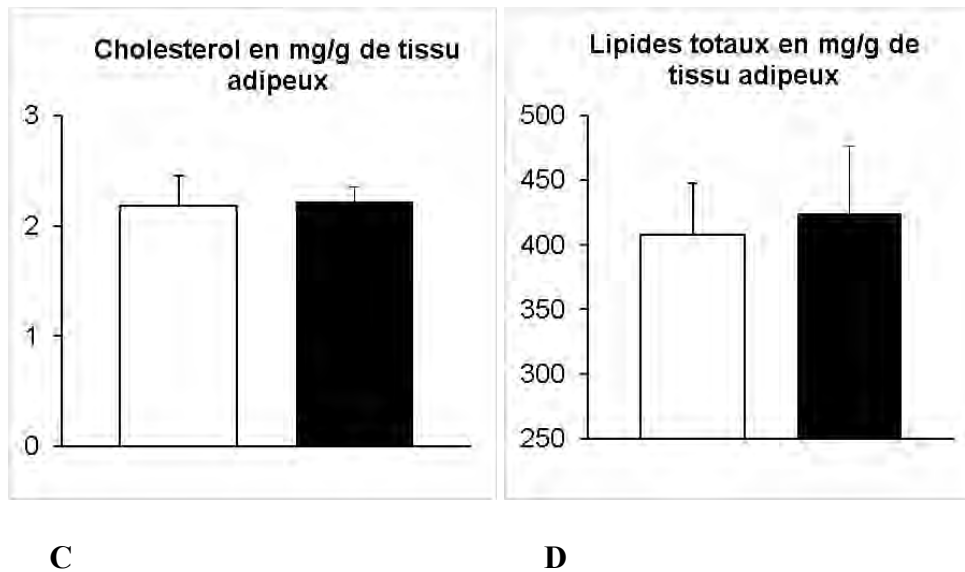


Figure 9. Taux de (A) triglycérides (« p-value » = 0.7488), (B) phospholipides (« p-value » = 0.4233), (C) cholestérol (« p-value » = 0.8728) et (D) lipides totaux (« p-value » = 0.7488) dans le tissu adipeux des souris WT (en blanc) et Mttp-iKo (en noir) en milligrammes par gramme de tissu

Par la suite, une analyse du tissu hépatique a été faite (figure 10). Cette analyse montre un taux de lipides plus élevé chez les souris contrôle par rapport aux souris Mttp-iKO. En effet, les taux de triglycérides et de cholestérol sont significativement effondrés chez les souris déficientes en MTTP (figures 10.A et 10.C). La différence observée concernant les phospholipides (figure 10.B) est à la limite de la significativité. Ceci semble contradictoire avec les observations menées chez les patients chez qui on décrit notamment la stéatose hépatique parmi les symptômes.

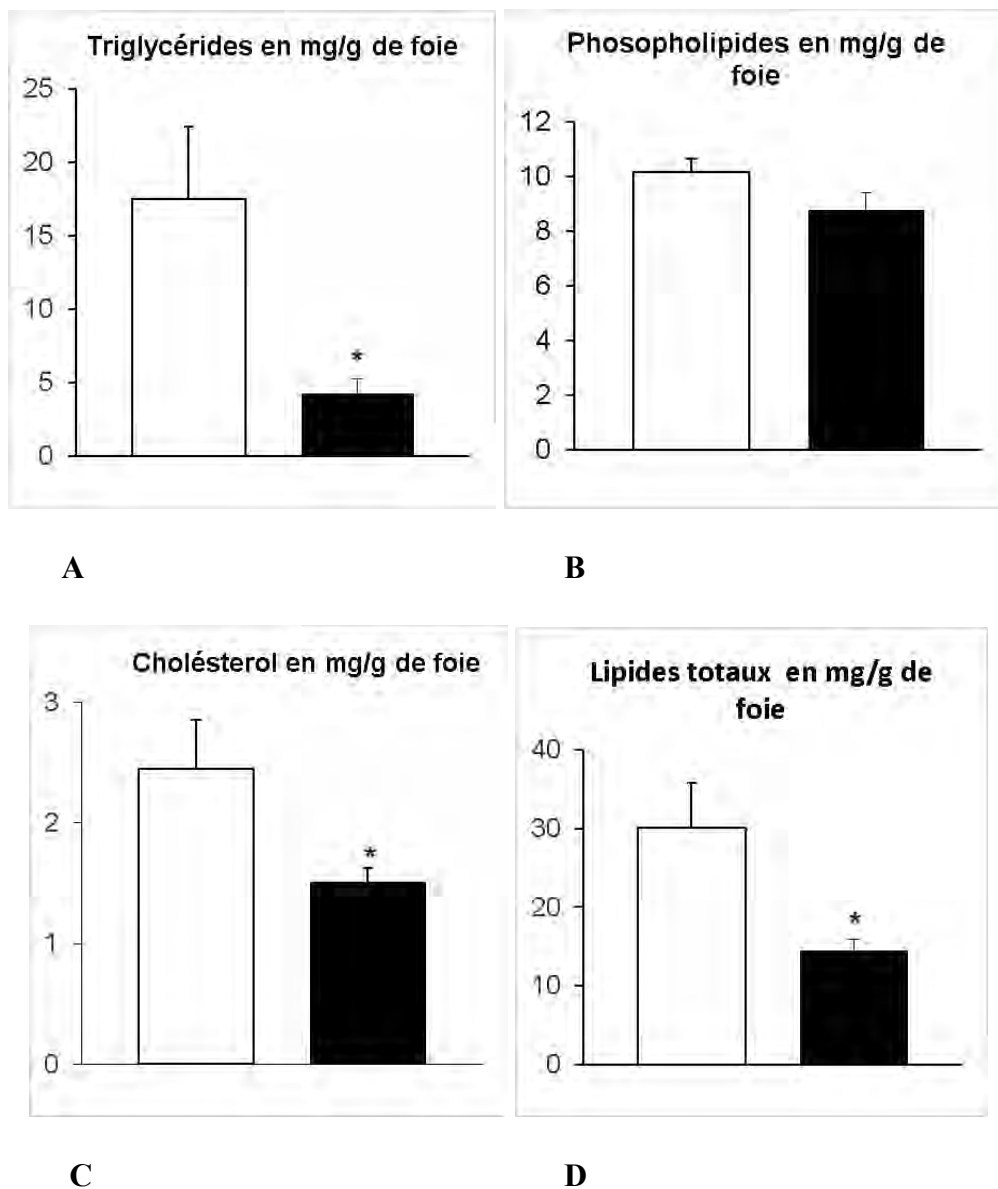


Figure 10. Taux de (A) triglycérides (« p-value » = 0.0163), (B), phospholipides (« p-value » = 0.0547), (C) cholestérol (« p-value » = 0.0250) et (D) lipides totaux (« p-value » = 0.0104) dans le foie des souris WT (en blanc) et Mtp-iKo (en noir) en milligrammes par gramme de tissu

Au niveau plasmatique, les résultats révèlent des taux de lipides significativement diminués chez les souris *Mttp*-iKo par rapport aux souris contrôle. Ces résultats sont cohérents avec le défaut d'absorption intestinal causé par la mutation entraînant un effondrement des concentrations lipidiques plasmatiques (figure 11).

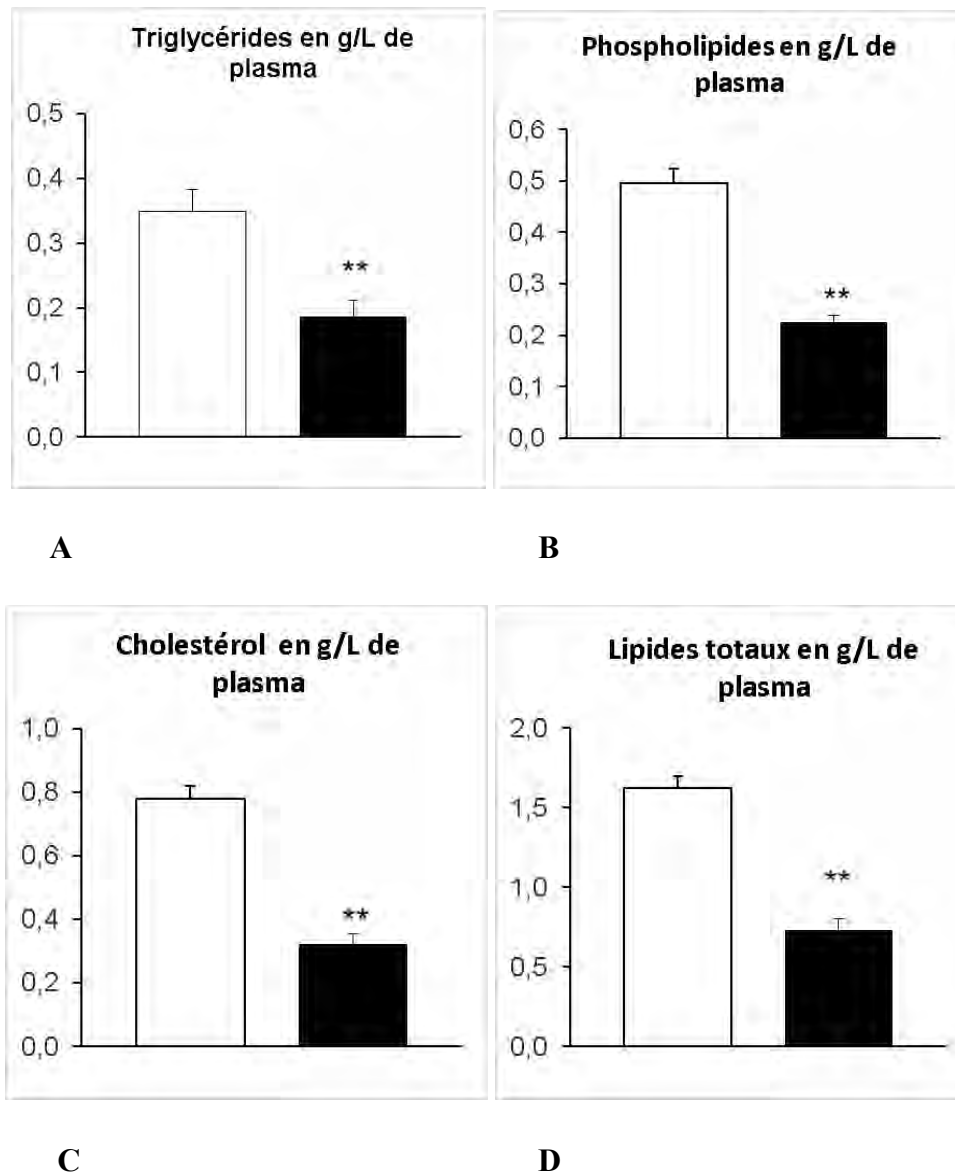
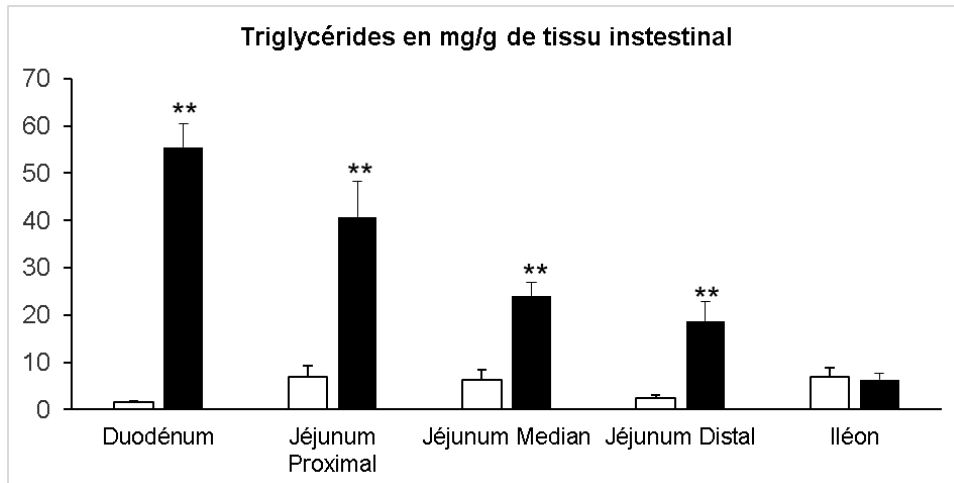


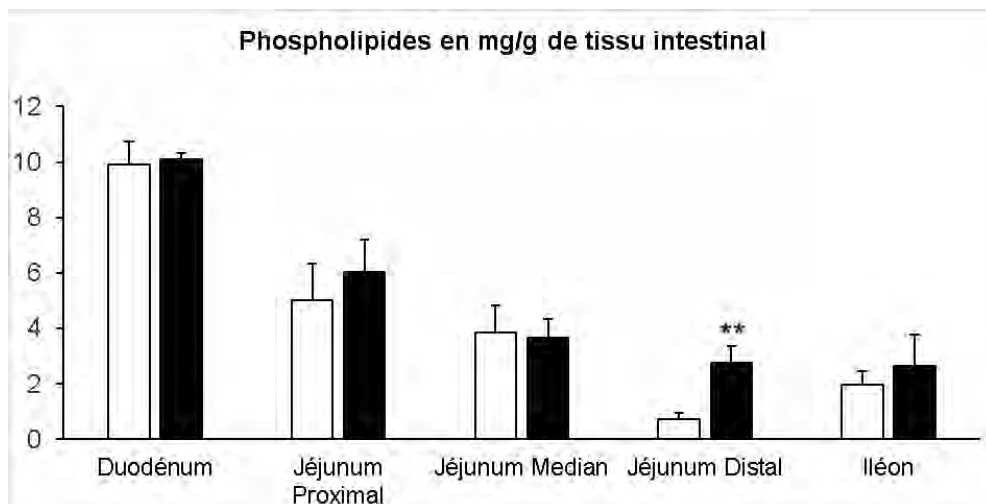
Figure 11. Taux de (A) triglycérides (« p-value » = 0.004), (B) phospholipides (« p-value » = 0.004), (C) cholestérol (« p-value » = 0.004) et (D) lipides totaux (« p-value » = 0.004) dans le plasma des souris WT (en blanc) et *Mttp*-iKO (en noir) en milligrammes par gramme de tissu.

Enfin, l'analyse du tissu intestinal permet de confirmer une quantité de triglycérides significativement augmentée chez les souris *Mttp*-iKO, contrairement aux souris contrôles (Figure 12). Ces concentrations supposent une accumulation de triglycérides au niveau des cellules intestinales. Il faut cependant noter que les quantités de phospholipides et de cholestérol ne présentent pas de différence significative entre les deux groupes (figures 12.B et 12.C).



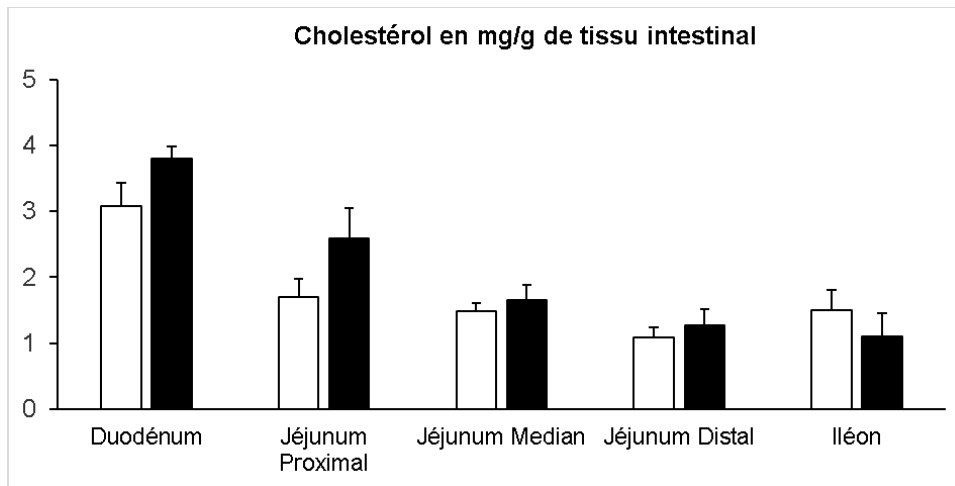
« p-value » : 0.004 ; 0.004 ; 0.0062 ; 0.004 ; 0.8551

A



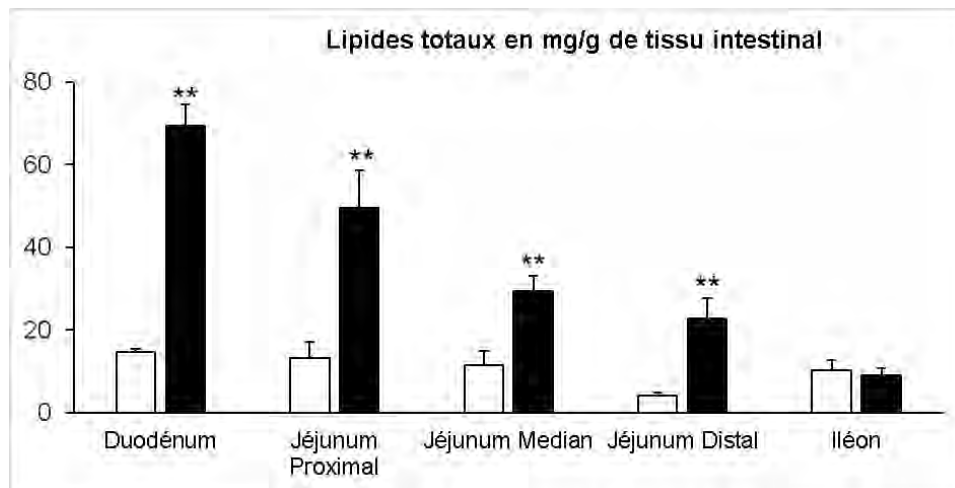
« p-value » : 0.5218 ; 0.3367 ; 0.99 ; 0.0065 ; 0.9

B



« p-value » : 0.0547 ; 0.1441 ; 0.7150 ; 0.8728 ; 0.2623

C



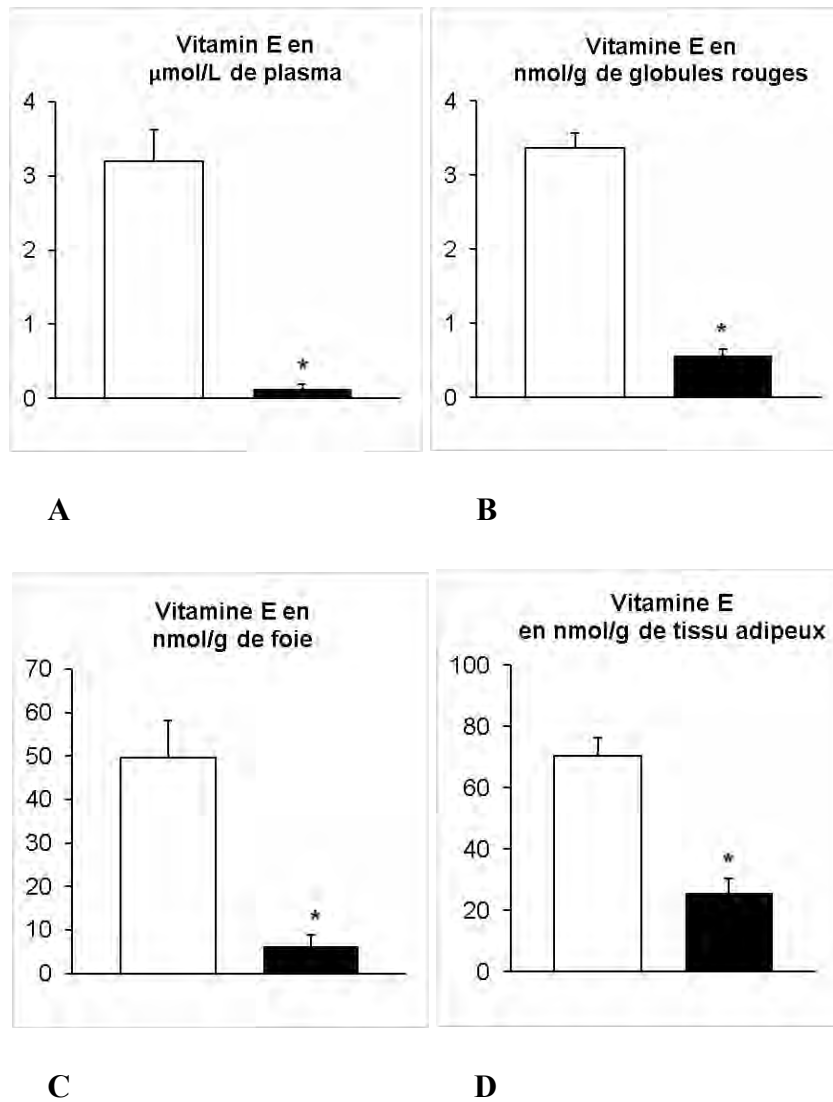
« p-value » : 0.004 ; 0.065 ; 0.0176 ; 0.04 ; 0.7488

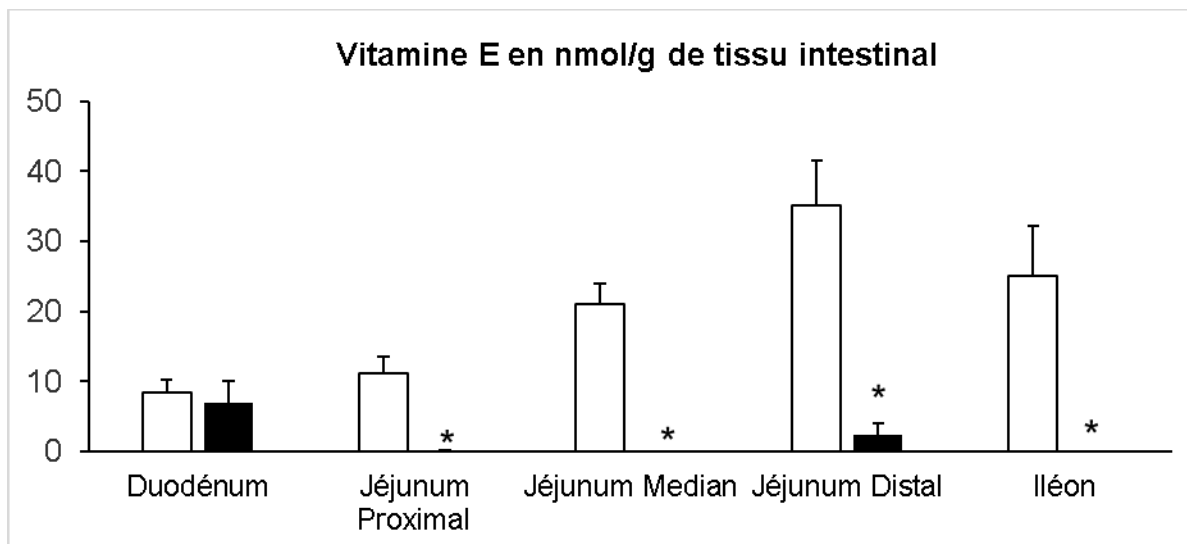
D

Figure 12. Taux de (A) triglycérides, (B) phospholipides, (C) cholestérol et (D) lipides totaux dans les différentes zones anatomiques de l'intestin des souris WT (en blanc) et Mttp-iKO (en noir) en milligrammes par gramme de tissu.

b) Résultats des statuts vitaminiques E

Dans un dernier temps, les concentrations en vitamine E ont été étudiées. On observe ainsi, des concentrations plasmatiques et hépatiques effondrées (figure 13.A et 13.C), de façon similaire aux taux de triglycérides. A l'inverse, les concentrations intestinales (figure 13.D) sont significativement abaissées, contrairement à ce qui a été constaté pour les triglycérides dont l'accumulation est significative. L'absorption de la vitamine E étant, *a priori*, conjointement liée à celle des triglycérides, le développement d'un modèle cellulaire *in-vitro*, s'est avéré nécessaire afin de comprendre cette disparition intra entérocytaire et obtenir des éclaircissements sur le métabolisme de la vitamine E.





E

Figure 13. Concentrations de vitamines E dans (A) le plasma (« p-value » = 0.0061), (B) les érythrocytes (« p-value » = 0.0062), (C) le foie (« p-value » = 0.004), (D) le tissu adipeux (« p-value » = 0.004) et dans (E) les différentes zones anatomiques de l'intestin (« p-value » : 0.004 ; 0.065 ; 0.0176 ; 0.04 ; 0.7488) des souris WT (en blanc) et Mttp-iKO (en noir) en nanomole par gramme de tissu.

2. Modèle cellulaire Caco-2/TC7

Deux lignées de cellules MTP- ou SAR1B-KO a été créés à partir de cellules intestinales humaines Caco-2. Afin de créer ces cellules, plusieurs étapes de mise en place du protocole ont été nécessaire et vont être détaillées.

a) Test de confluence

Lors d'une expérience de transfection, les cellules doivent rester 48 heures en culture en contact avec les particules liposomales permettant la délivrance des complexes Cas9/ARNg. Ainsi, afin de favoriser une transfection efficace tout en assurant un taux de survie cellulaire correct et suffisant, il est important de déterminer la confluence initiale optimale. Pour cela, un test d'efficacité de la transfection a été effectué sur des cellules à 30% et 40% de confluence. Ce test repose sur la capacité d'une enzyme à digérer les hétéroduplex d'ADN formés après réparation non homologe d'une cassure double brin. Les hétéroduplex témoignent de l'introduction d'une mutation sur au moins un des deux brins de l'ADN ciblé par le système CRISPR/Cas9. Ce test a été réalisé en ciblant le gène domestique HPRT1. Ainsi, la protéine Cas9 et l'ARNg de HPRT1 (gène domestique) ont

été transfectés dans la lignée cellulaire Caco-2/TC7 conformément au protocole du fabricant. Après 48 heures de culture, les cellules ont été récoltées pour analyse et calcul du pourcentage de cellules ayant subi une mutation par réparation non homologe.

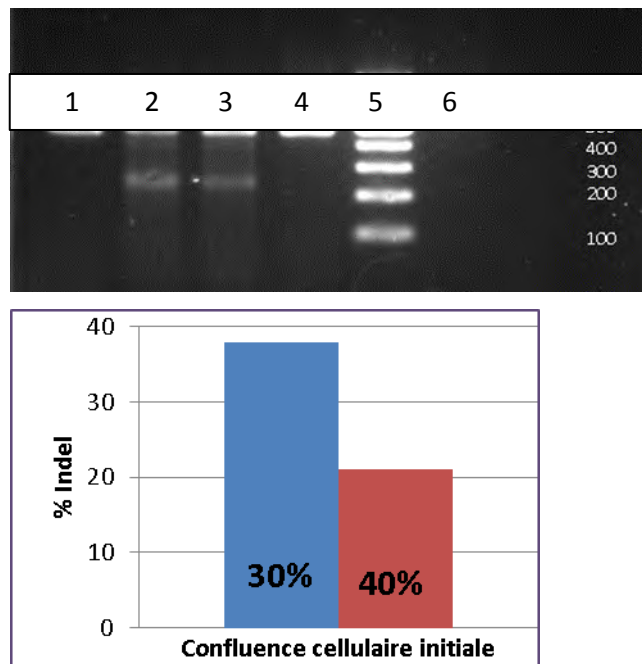


Figure 14. Détermination de la confluence optimale pour la transfection. A. Produits d'amplification détectés sur gel d'agarose (E-gel EX à 2%) obtenus à partir de l'ADN extrait de la lignée cellulaire Caco-2 / TC7 (1) transfectées à 30% de confluence avant test d'efficacité par digestion enzymatique, (2) transfectées à 30% de confluence après test d'efficacité par digestion enzymatique, (3) transfectées à 40% de confluence avant test d'efficacité par digestion enzymatique et (4) transfectées à 30% de confluence après test d'efficacité par digestion enzymatique. Le marqueur de taille est représenté en (5) et le contrôle positif pour la PCR en (6). B. Le graphique représentant le % d'« indels » calculé selon la formule présentée précédemment

Comme le montre la figure 14 ci-dessus, le pourcentage d'« Indels » dans les cellules ayant subi une transfection à 30% de confluence est supérieur d'environ 17% à celui des cellules transfectées à 40%. Cet essai a permis de conclure à une transfection plus efficace à moindre confluence et la suite des travaux ont été menés sur cellules caco-2 / TC7 à 30% de confluence.

b) Test d'efficacité des ARN guide

Pour assurer une transfection efficace, il est nécessaire d'utiliser un ARN guide ciblant spécifiquement la séquence d'ADN à muter. Pour cela, des tests de transfection ont été réalisés avec différents ARN guide ciblant les gènes d'intérêt et l'efficacité de la transfection a été calculée pour chaque condition, comme précédemment.

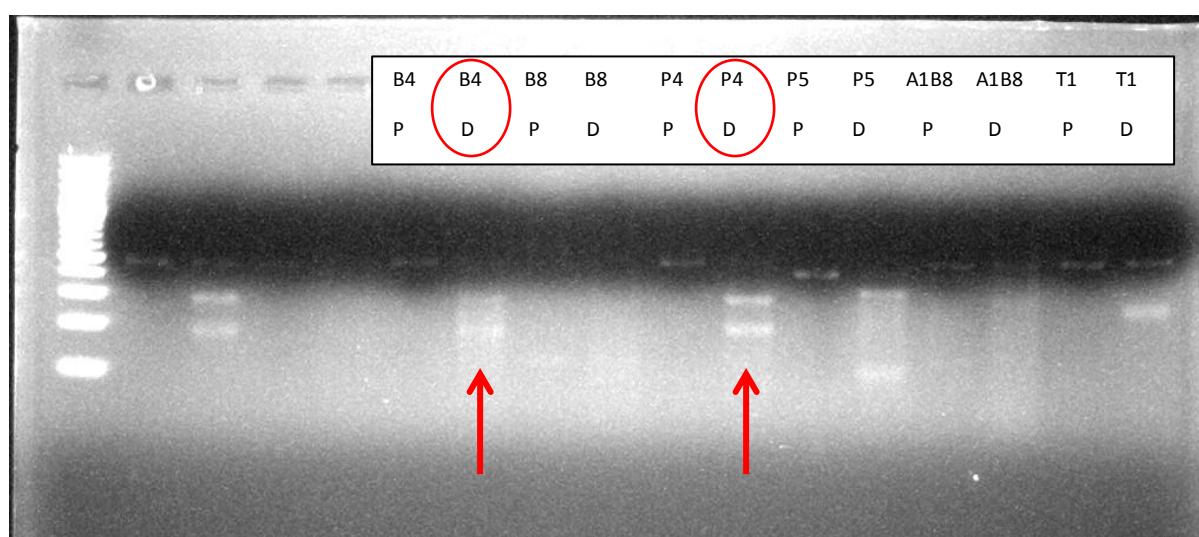
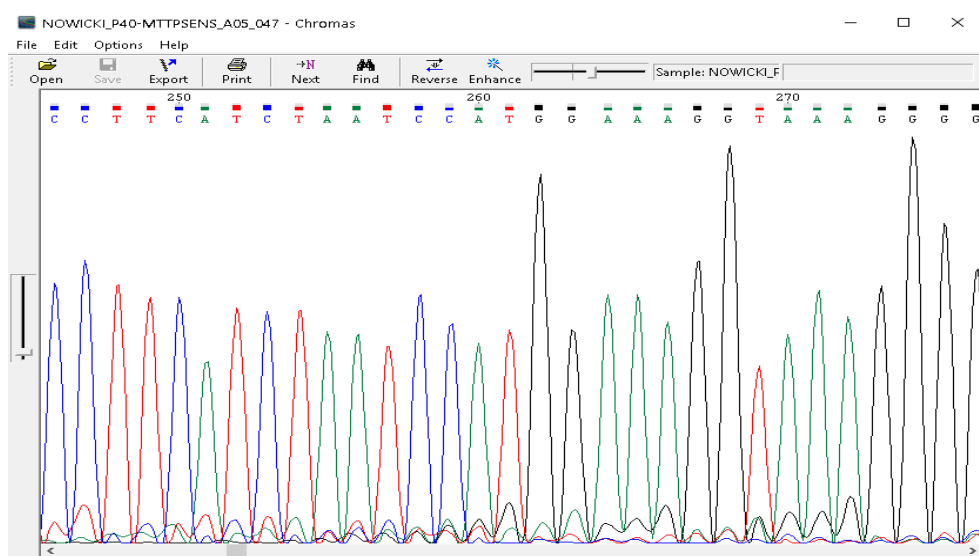


Figure 15. Détermination des ARN guide efficaces et spécifiques pour la transfection. Produits d'amplification détectés sur gel d'agarose (E-gel EX à 1%) obtenus à partir de l'ADN extrait de la lignée cellulaire Caco-2/TC7 transfectées avec deux ARN guide différents pour chaque gène (P) avant le test d'efficacité par digestion enzymatique et (D) après le test d'efficacité par digestion enzymatique. B4 = ARN guide n°414 ciblant le gène SAR1B ; B8 = ARN guide n°418 ciblant le gène SAR1B ; P4 = ARN guide n°004 ciblant le gène MTTP ; P5 = ARN guide n°005 ciblant le gène MTTP ; T1 = ARN guide ciblant le gène HPRT1 utilisé comme contrôle positif.

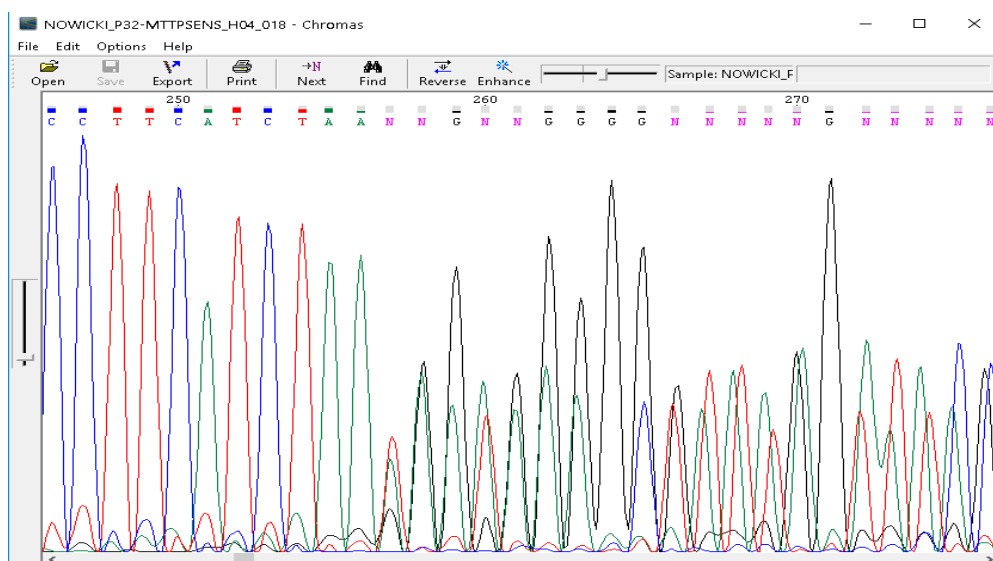
Ces résultats montrent que, pour chaque gène d'intérêt, un seul ARN guide a permis l'introduction d'une mutation détectée par l'enzyme de digestion (figure 15). Ces ARN guide (ARNg n°414 ciblant le gène SAR1B et l'ARNg n°004 ciblant le gène MTTP) ont donc été utilisés par la suite dans les expériences de transfection.

c) *Transfection et séquençage de l'ADN*

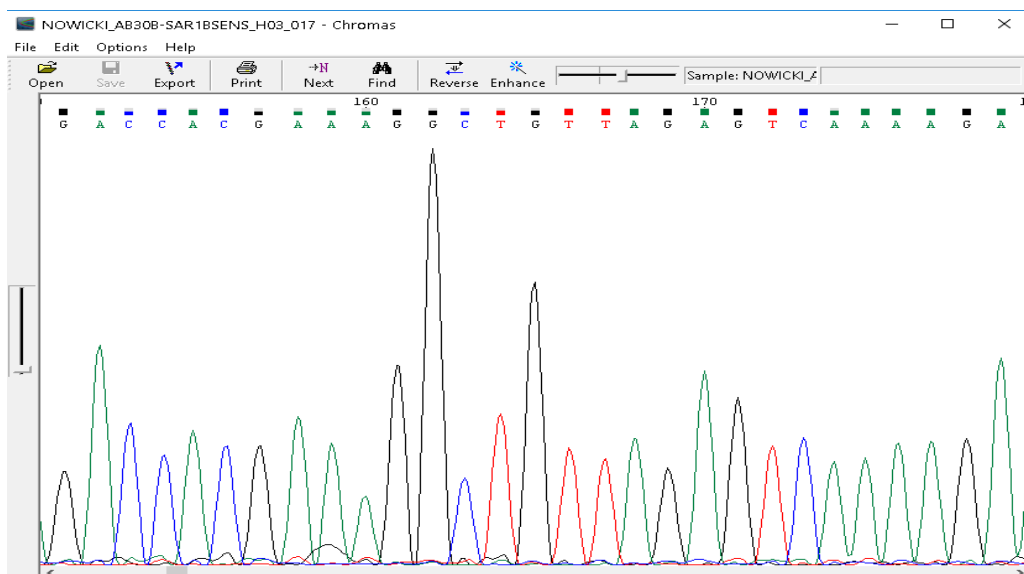
Après avoir été transfectés en plaques 24 puits en utilisant l'ARNg préalablement sélectionné, les clones ont été isolés par dilution limite sur des plaques 96 puits. Cette étape a permis d'obtenir 47 clones vivants possiblement invalidés pour le gène MTTP et 57 clones vivants pour le gène SAR1B. Par la suite, l'ADN génomique a été extrait afin d'être séquençé et caractérisé. Sur l'ensemble des clones vivants, 2 clones transfectés avec l'ARNg ciblant MTTP et 2 clones transfecté avec l'ARNg ciblant SAR1B ont été analysés : le clone MTTP-KO n°40 (P40), le clone MTTP-KO n°32 (P32), le clone SAR1B-KO n°30 (AB30) et le clone SAR1B-KO n° 4 (B4)



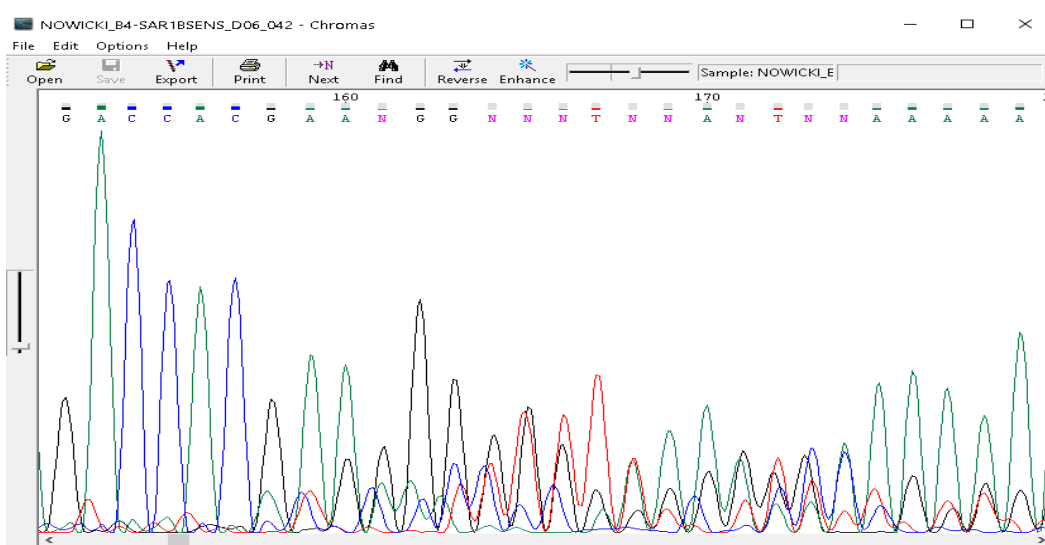
A



B



C



D

Figure 16. Résultats du séquençage selon la méthode de Sanger de l'ADN génomique extrait des clones de cellules MTTP-KO numéro 40 (A) MTTP-KO numéro 32 (B) SAR1B-KO numéro 4 (C) et SAR1B-KO numéro 30 (D)

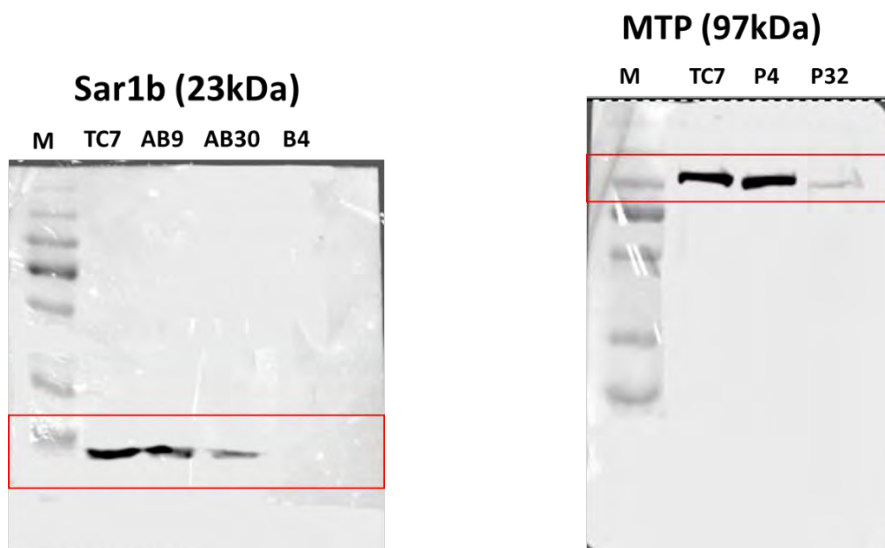
Le séquençage de l'ADN (figure 16) a montré deux types de résultats : des clones possédant une séquence unique parfaitement identifiable, sans mutation, ou plusieurs séquences d'ADN se chevauchant probablement du fait de mutations monoalléliques. Le séquençage a ainsi permis de souligner la présence de mutations dans les gènes de certains clones. Ainsi les clones cellulaires « P40 » et « AB30 » ne présentaient aucune mutation et ont été utilisés comme contrôles négatifs par la suite, tandis que les clones cellulaires « P32 » et « B4 » présentaient au moins une mutation monoallélique. En ne tenant compte que de la séquence majoritaire, statistiquement la plus probable, les clones cellulaires « P32 » et « B4 » semblent posséder une mutation conduisant à une modification de la séquence d'acides aminés de la protéine comme résumé dans le tableau 7 ci-dessous.

Clone	Séquence de l'ADN cible	Séquence du clone	Conclusion
P40	CTCCTTCATCTAATCCATGGAAAG	CTCCTTCATCTAATCCATGGAAAG	Pas de mutation
P32	CTCCTTCATCTAATCCATGGAAAG	CTCCTTCATCTAATAGAGGGGGGT	Modification de la séquence d'acide aminé LLHLIHGK → LLHLIEGG
AB30	CGAAAGGCTGTTAGAGTCAA	CGAAAGGCTGTTAGAGTCAA	Pas de mutation
B4	CGAAAGGCTGTTAGAGTCAA	GAAGGGGGTTTTAAAGTCAAAAAA	Modification de la séquence d'acide aminé ERLLESKE → EGGFKVKK

Tableau 7. Résumé des séquences des 4 clones de cellules analysés

d) Analyse protéique

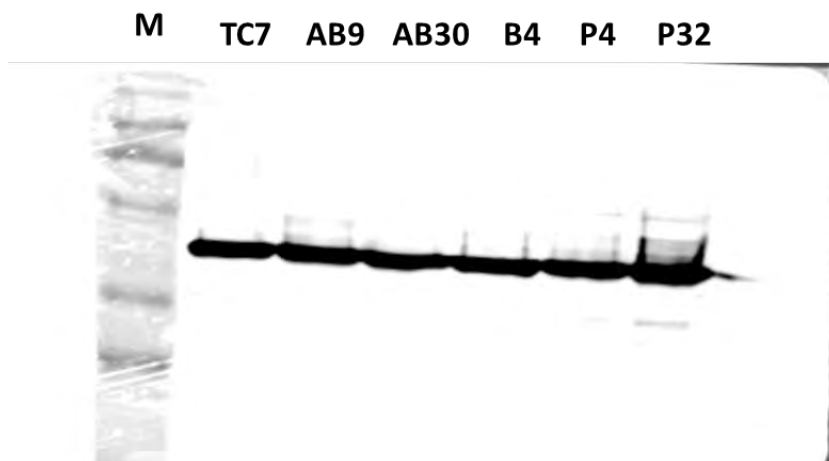
Afin de s'assurer que la mutation engendrée par le système CRISPR/Cas9 entraîne une réelle modification au niveau de la transcription et de la synthèse de la protéine, une analyse en Western-Blot a été faite après extraction du contenu protéique des clones étudiés. Les résultats du Western-Blot sont présentés ci-dessous. Il faut noter que ces analyses présentent également des clones cellulaires qui n'ont pas été cités jusque-là mais qui font partis du même processus expérimental.



A

B

β -actine (42kDa)



C

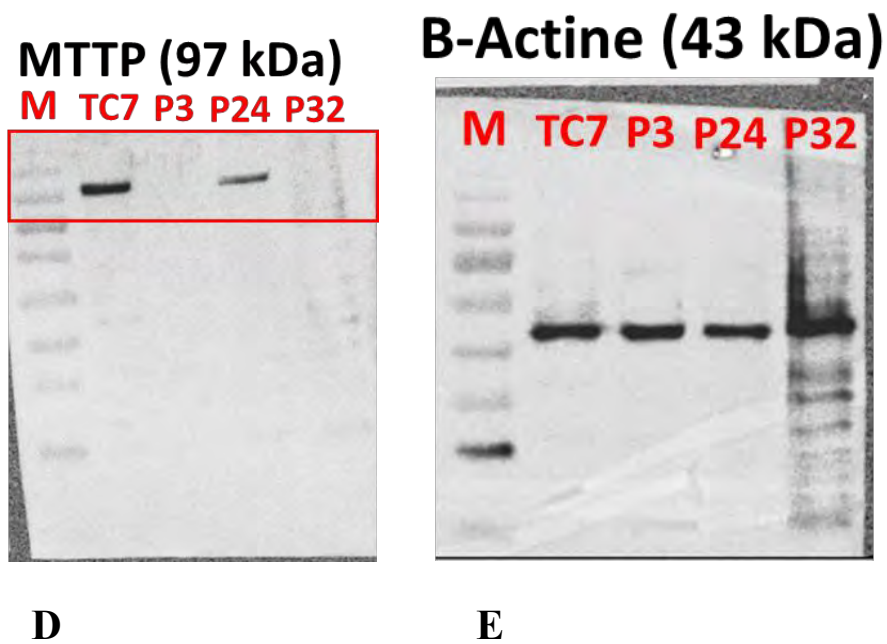


Figure 17. Première analyse par Western-Blot des clones cellulaires mutés avec un anticorps primaire dirigé contre SAR1B (A), MTTP (B), β -actine (C) et deuxième analyse des clones mutés avec un anticorps dirigé contre MTTP (D) et β -actine (E) afin de confirmer les résultats concernant le clone « P32 ».

Ces résultats (figure 17) permettent de confirmer l'absence de protéine MTTP dans le clone cellulaire « P32 » ainsi que l'absence de protéine Sar1b dans le clone « B4 ».

L'absence de protéine en réponse à la mutation générée par le système CRISPR/Cas9 ayant été confirmée, une analyse en microscopie et une analyse du métabolisme de la vitamine E ont pu être envisagées.

e) Sécrétion des lipides et de la vitamine E

Ainsi, les clones cellulaires ont été observés au microscope optique après coloration au « Oil Red O » afin de caractériser le contenu lipidique cytoplasmique. Les images obtenues en microscopie à contraste interférentiel, (figure 18) ont montré une accumulation de gouttelettes lipidiques plus nombreuses et/ou plus larges, dans les clones mutés en comparaison au clone non muté considéré comme contrôle négatif.

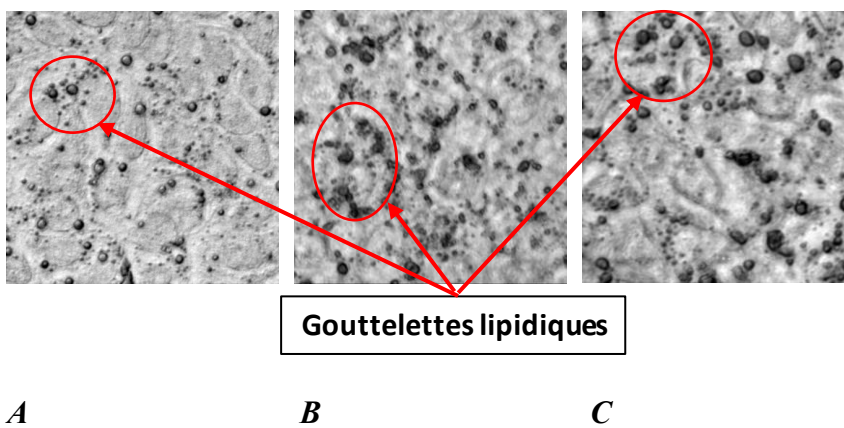


Figure 18. Clones mutés observés au microscope à contraste interférentiel ($G: \times 760$), après coloration au « Oil Red O ». (A) Clone MTTP-KO n°40 (contrôle négatif), (B) clone SAR1B-KO n°4, (C) clone MTTP-KO n°32.

À la suite de ces observations, une étude de la sécrétion de vitamine E a été faite par apport de micelles chargées en α -tocophérol dans le milieu de culture après mise à jeun des cellules. Le pourcentage relatif de sécrétion de vitamine E a été déterminé en considérant le clone cellulaire « P40 » comme un contrôle de sécrétion positif. Les graphiques suivant (figure 19 et 20) montrent une diminution significative de la sécrétion de vitamine E dans les clones cellulaires Sar1b- et MTTP-KO sans altération de la capacité d'absorption. Ces résultats semblent donc indiquer que la vitamine E est séquestrée par les cellules ayant subi une mutation que ce soit une mutation sur la protéine MTTP ou la protéine Sar1b bien que la sécrétion soit plus fortement altérée dans le cas de la protéine MTTP. Cette observation est d'ailleurs en adéquation avec l'observation faite chez les patients chez qui les symptômes semblent plus graves et plus marqués dans le cas de l'abêtalipoprotéïnémie (mutation MTTP) par rapport à la maladie de rétention des chylomicrons (mutation Sar1b).

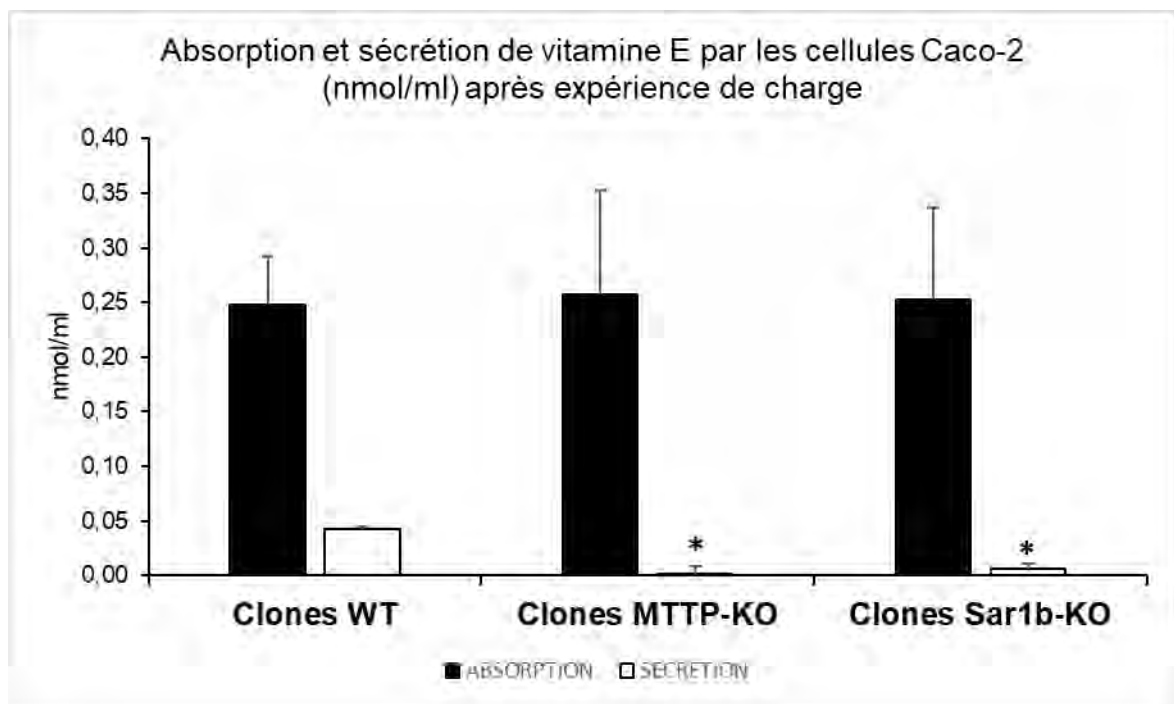


Figure 19. Absorption et sécrétion de vitamine E par les cellules TC7 sauvage (WT), MTTP-KO ou Sar1b-KO exprimé en nanomole par millilitre ($p < 0.001$)

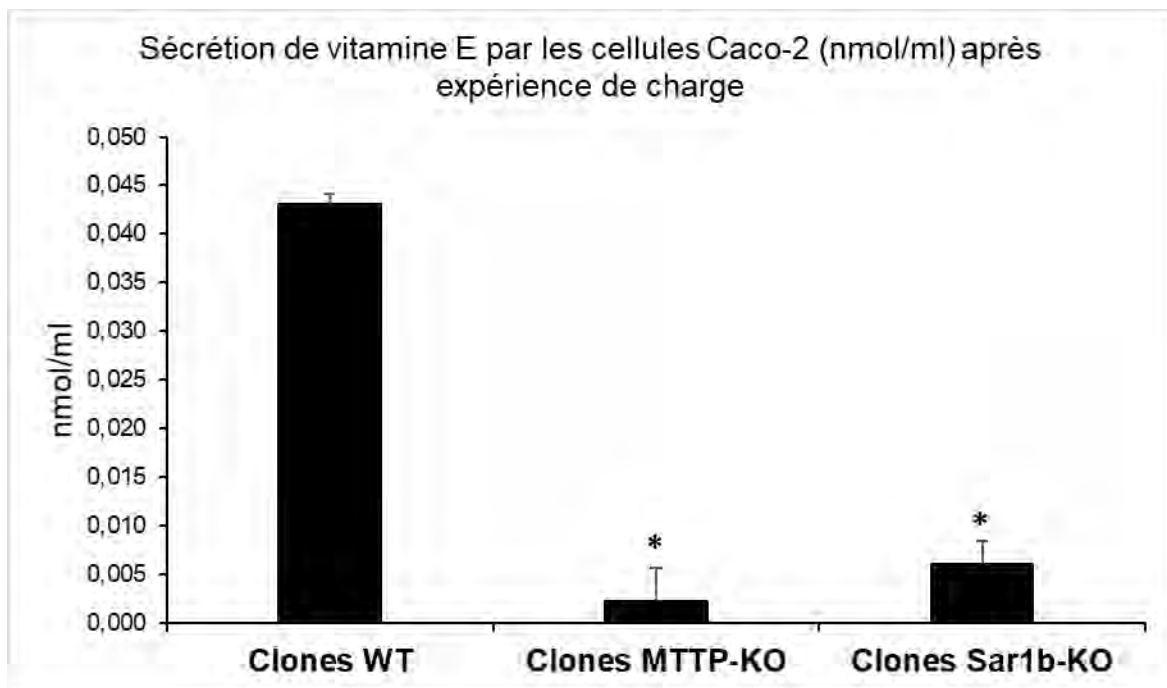


Figure 20. Sécrétion de vitamine E par les cellules TC7 sauvage (WT), MTTP-KO ou Sar1b-KO exprimé en nanomole par millilitre ($p < 0.001$)

Afin de déterminer si la vitamine E s'accumule dans le cytoplasme de la cellule du fait de l'absence de sécrétion, la quantité de vitamine E intra-cellulaire a été déterminée. Les résultats n'étant pas statistiquement significatifs, ils semblent indiquer qu'il n'y a pas d'accumulation de vitamine E au sein de la cellule dans les clones mutés, par rapport aux cellules sauvages (figure 21).

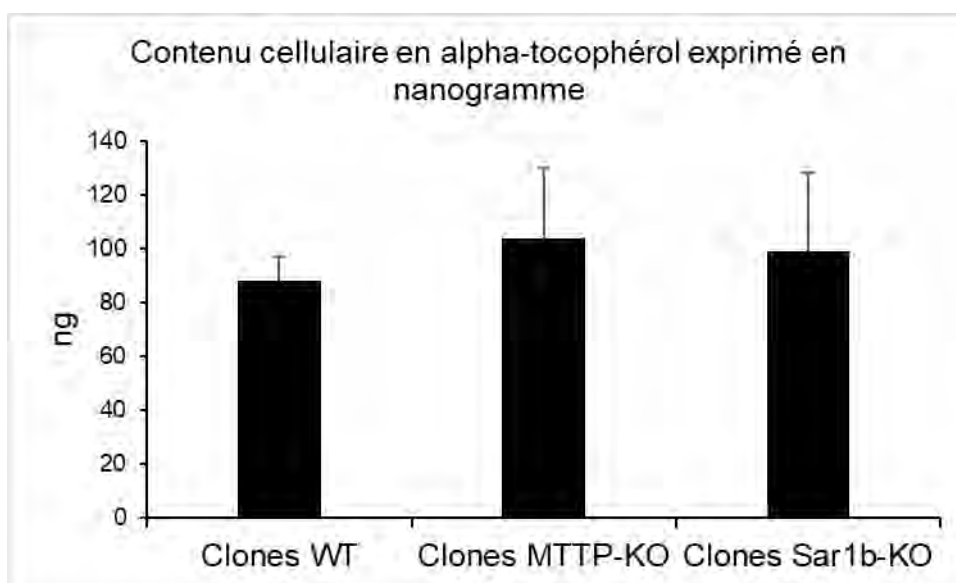


Figure 21. Accumulation de vitamine E par les cellules TC7 sauvage (WT), MTTP-KO ou Sar1b-KO exprimé en nanogramme

C. DISCUSSIONS ET CONCLUSION

1. Discussion

a) *Modèle de souris Mttp-iKO*

Les souris *Mttp-iKO* apparaissent de prime abord comme un modèle relativement pertinent pour l'étude de l'abêtalipoprotéinémie. En effet, les résultats sont proches de ceux observés chez les patients porteurs de la mutation avec une diminution significative de la concentration plasmatique en lipides associée à une forte accumulation au niveau du tissu intestinal. Ces résultats semblent plus significatifs en ce qui concerne les triglycérides et le cholestérol par rapport aux phospholipides probablement en raison des possibles régulations métaboliques de ces derniers. La concentration intestinale en triglycérides révèle que ces derniers sont toujours absorbés, réestérifiés mais ne sont plus sécrétés suggérant qu'ils sont la principale forme de stockage lipidique dans l'entérocyte. Cependant, il est important de noter que l'inactivation génique de MTP étant létale in utero, l'inactivation se fait de façon ciblée au niveau du tissu intestinal et n'affecte donc pas directement le foie, expliquant l'absence d'accumulation observée au niveau hépatique. Il en est de même pour le tissu adipeux qui n'est pas directement impacté par les mutations, du fait de son rôle majoritairement de stockage avec un *turn over* probablement très lent.

Les résultats paradoxaux sur les taux effondrés de vitamine E n'étaient pas prévus. En effet, partant du postulat que le métabolisme de la vitamine E est directement dépendant du métabolisme des triglycérides, la diminution de concentration significative observée dans tous les tissus semble cohérente mais l'absence d'accumulation de vitamine E au niveau intestinal soulève plusieurs questions :

- La vitamine E est-elle dégradée ou oxydée au sein même de l'entérocyte en raison d'un environnement cellulaire hautement pro-oxydant ?
- La mutation neutralisant la voie des chylomicrons, la vitamine E suit-elle la voie des HDL ? Est-elle ré-effluée au niveau apical ?

b) *Modèle cellulaire Caco-2/TC7*

Afin de mieux comprendre le métabolisme de la vitamine E et les résultats obtenus chez la souris, un modèle cellulaire de CMRD et d'ABL a été créé à l'aide de cellules Caco-2 au laboratoire C2VN de Marseille. En effet, ces cellules, dérivées d'un adénocarcinome de colon humain, ont la capacité de se différencier spontanément en cellules exprimant plusieurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles spécifiques des entérocytes humains. En particulier, la plupart des études menées sur les cellules Caco-2 ont démontrées leur capacité à synthétiser les principaux lipides tels que les triglycérides, les phospholipides et les esters de cholestérol ; elles représentent ainsi un modèle *in vitro* intéressant pour l'étude du métabolisme intestinal des lipoprotéines.

L'invalidation des gènes SAR1B et MTTP, s'est faite grâce au système d'édition du génome CRISPR/Cas9. En effet, l'inactivation d'un gène permet d'étudier spécifiquement une voie métabolique contrairement aux inhibiteurs chimiques souvent capable de cibler plusieurs protéines au sein d'une cellule. De plus, cette technique s'est considérablement améliorée au cours des dix dernières années, permettant l'invalidation des gènes de façon plus efficace et à moindre coût. L'avantage substantiel de cette technologie par rapport à la technologie des TALENs est sa mise place plus simple. En effet, alors que la technique des TALENs nécessite d'adapter la séquence d'acides aminés de leur DBD à chaque cible génomique, la technique du CRISPR/Cas9 repose sur une nucléase Cas9 inchangée et un simple ARN guide spécifique. De plus, cette technique permet une invalidation permanente et stable, à l'inverse des siRNA dont l'effet n'est que transitoire. D'ailleurs, au cours de ce travail, l'invalidation des gènes d'intérêt entraînant une absence de synthèse des protéines étudiées a pu être confirmée. Une fois les modèles validés, il a été possible de faire des études d'absorption et de sécrétion de la vitamine E par la cellule entérocytaire afin d'investiguer le paradoxe retrouvé dans le modèle animal. Ces expériences ont mis en évidence une absence de sécrétion de vitamine E par les clones mutés, associée à une absence d'accumulation de cette même vitamine dans l'entérocyte. Parmi les hypothèses que nous pouvons formuler citons principalement une consommation intra cellulaire de vitamine E, puissant piègeur de radicaux libres, pour contrer un niveau élevé de stress oxydant, notamment *via* la peroxydation lipidique comme cela a pu être démontré au niveau des plaquettes des patients hypocholestérolémiques (229). Ainsi, d'autres expériences *in vitro*, telles que la quantification des marqueurs pro-oxydants dans l'intestin de souris ou dans les clones

cellulaires doivent encore être effectuées pour pouvoir avancer dans la compréhension de ces résultats.

2. Conclusions et perspectives

Ce travail avait pour but de présenter les avancées concernant l'étude du métabolisme de la vitamine E dans les hypocholestérolémies intestinales primaires, maladies rares dont les symptômes invalidants neurologiques sont liés en partie à la carence en cette vitamine. Il n'existe pas d'explication claire à l'échec de la supplémentation en vitamine E pour prévenir la survenue des complications ophtalmiques chez certains patients. Il était donc important de développer de nouveaux modèles d'études afin d'étudier le métabolisme intra-entérocytaire de cette vitamine et essayer ainsi de mieux comprendre les échecs de prévention.

Notre étude a démontré que l'inactivation du gène MTTP chez la souris entraîne bien une malabsorption intestinale des lipides se manifestant par une accumulation de graisses dans la lumière intestinale et une hypocholestérolémie importante, comme observé chez les patients ABL et CMRD. Cependant, de façon paradoxale, la concentration entérocytaire de vitamine E apparaît effondrée malgré une accumulation importante de triglycérides.

Afin d'élucider cette carence en vitamine E entérocytaire, nous avons développé deux modèles de cellules intestinales (lignée cellulaire d'adénocarcinome de côlon humain) invalidées soit pour le gène MTTP (ABL) soit pour le gène SAR1B (CMRD) *via* le système d'édition du génome CRISPR/Cas9. Ces travaux ont abouti à deux clones mutés viables dont l'inactivation génique a pu être caractérisée et l'absence de protéine confirmée. Une fois ces modèles cellulaires validés, des tests d'absorption et de sécrétion de vitamine E par ces cellules ont été effectués et ont pu mettre en évidence une absence de sécrétion mais également d'accumulation de vitamine E au sein des clones mutés.

Des études mécanistiques sont donc maintenant nécessaires pour comprendre les voies métaboliques mises en jeu dans les cellules mutées et afin d'expliquer les taux effondrés de cette vitamine dans la cellule intestinale.

Enfin, ces résultats suggèrent fortement que les souris *Mttp*-iKO et les cellules Caco-2 mutées représentent des outils intéressants pour comprendre le métabolisme de la vitamine E et des lipides dans l'intestin des patients ABL et CMRD.

BIBLIOGRAPHIE

1. EVANS H. M. et BISHOP K. S. On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science*. 8 décembre 1922. Vol. 56, n° 1458, pp. 650- 651.
2. FERNHOLZ E. On the constitution of α -tocopherol. *Journal of the American Chemical Society*. 1938. Vol. 60, n° 3, pp. 700–705.
3. EVANS H. M., EMERSON O H. et EMERSON, G A. The Isolation from Wheat Germ Oil of an Alcohol, α -Tocopherol, Having the Properties of Vitamin E. *Nutrition Reviews*. 1974. Vol. 32, n° 3, pp. 80- 82.
4. WASSERMAN R. H. et TAYLOR A. N. Metabolic Roles of Fat-Soluble Vitamins D, E, and K. *Annual Review of Biochemistry*. 1972. Vol. 41, n° 1, pp. 179- 202.
5. BIERI J. G. et EVARTS R. P. Vitamin E activity of gamma-tocopherol in the rat, chick and hamster. *The Journal of Nutrition*. 1974. Vol. 104, n° 7, pp. 850- 857.
6. PENNOCK J. F. A reassessment of Tocopherol chemistry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1964. Vol. 17, n° 5, pp. 542- 548.
7. KEIL B., et WHELAN J. Nomenclature of Tocopherols and Related Compounds. *European Journal of Biochemistry*. 1982. Vol. 123, n° 3, pp. 473- 475.
8. CHEESEMAN K. Biokinetics in humans of RRR- α -tocopherol: The free phenol, acetate ester, and succinate ester forms of vitamin E. *Free Radical Biology and Medicine*. 1995. Vol. 19, n° 5, pp. 591- 598.
9. BEN- SHABAT, *et al.* Use of alpha-tocopherol esters for topical vitamin E treatment: evaluation of their skin permeation and metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013. Vol. 65, n° 5, pp. 652- 658.
10. ZINGG J-M., *et al.* Molecular and cellular activities of vitamin E analogues. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2007. Vol. 7, n° 5, pp. 543- 558.
11. MONSEN E. R. *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids*. 2000. Academy of Nutrition and Dietetics. ISBN 978-0-309-06935-9.
12. JENSEN, S. K, *et al.* α - Tocopherol Stereoisomers. *Vitamins & Hormones*. 1 janvier 2007. Vol. 76, pp. 281- 308.
13. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of tocopherols and related compounds. Recommendations 1981. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 10 décembre 1982. Vol. 49, n° 3, pp. 183- 185.
14. RUPÉREZ, F. J., *et al.* Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography. A*. 2001. Vol. 935, n° 1- 2, pp. 45- 69.
15. PREEDY V. R. et WATSON R. R. *The Encyclopedia of Vitamin E*. CABI, 2007. ISBN 978-1-84593-075-2.
16. THRELFALL, D. R. The Biosynthesis of Vitamins E and K and Related Compounds - ScienceDirect. *Vitamins & Hormones*. 1971. Vol. 29, n° Academic Press, pp. 153- 200.

17. BUCKE C. *et al.* The distribution and stability of α -tocopherol in subcellular fractions of broad bean leaves. *Phytochemistry*. 1968. Vol. 7, n° 5, pp. 693- 700.
18. HIRSCHBERG J. *et al.* Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999. Vol. 10, n° 2, pp. 186- 191.
19. JANISZOWSKA W. et PENNOCK, J.F. The Biochemistry of Vitamin E in Plants. *Vitamins & Hormones*. 1976. Vol. 34, pp. 77- 105.
20. LAURIDSEN, C., *et al.* Relative bioactivity of dietary RRR- and all-rac-alpha-tocopheryl acetates in swine assessed with deuterium-labeled vitamin E. *Journal of Animal Science*. 2002. Vol. 80, n° 3, pp. 702- 707.
21. BONRATH, W. Catalytic processes in vitamins synthesis and production. *Applied Catalysis A: General*. 2005. Vol. 280, n° 1, pp. 55- 73.
22. EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for vitamin E as alpha-tocopherol. *European Food Safety Authority*. 9 juillet 2015. Vol. 13, n° 7, pp. 4149.
23. PÉTER S., *et al.* A systematic review of global α -Tocopherol status as assessed by Nutritional Intake Levels and Blood Serum Concentrations. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2015. Vol. 85, n° 5- 6, pp. 261- 281.
24. KIM Y-N. *et al.* Vitamin E status of 20- to 59-year-old adults living in the Seoul metropolitan area of South Korea. *Nutrition Research and Practice*. 2015. Vol. 9, n° 2, pp. 192- 198.
25. TROESCH B., *et al.* Dietary surveys indicate vitamin intakes below recommendations are common in representative Western countries. *The British Journal of Nutrition*. 2012. Vol. 108, n° 4, pp. 692- 698.
26. SHILS M. E., OLSON J. A. et SHIKE M. *Modern nutrition in health and disease*. 1994.
27. Ciqual Table de composition nutritionnelle des aliments. [en ligne]. [Consulté le 3 septembre 2020]. Disponible à l'adresse : <https://ciqual.anses.fr/>
28. BOURRE J. M. et CLÉMENT M. [Vitamin E: comparison of efficiency of incorporation of alpha-tocopherol in the organs in comparison to gamma-tocopherol]. *Bulletin de l'Academie nationale de medecine*. 1996. Vol. 180, n° 4, pp. 813- 25; discussion 825-9.
29. BEHRENS W., et MADÈRE R. Interrelationship and competition of α - and λ -tocopherol at the level of intestinal absorption, plasma transport and liver uptake. *Nutrition research*. 1986. Vol. 3, n° 6, pp. 891- 897.
30. JIANG Q., *et al.* γ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001. Vol. 74, n° 6, pp. 714- 722.
31. ZONDLO F.M. *et al.* Final report on the safety assessment of Tocopherol, Tocopheryl Acetate, Tocopheryl Linoleate, Tocopheryl Linoleate/Oleate, Tocopheryl Nicotinate, Tocopheryl Succinate, Dioleoyl Tocopheryl Methylsilanol, Potassium Ascorbyl Tocopheryl Phosphate, and Tocophersolan. *Int J Toxicol*. 2002. Vol. 21, n° 3, pp. 51- 116.
32. GALAN P., *et al.* Serum concentrations of β -carotene, vitamins C and E, zinc and selenium are influenced by sex, age, diet, smoking status, alcohol consumption and corpulence in

a general French adult population. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2005. Vol. 59, n° 10, pp. 1181- 1190. DOI 10.1038/sj.ejcn.1602230.

33. CAMPBELL D., *et al.* Selenium and vitamin E status of healthy and institutionalized elderly subjects: analysis of plasma, erythrocytes and platelets. *British Journal of Nutrition*. 1989. Vol. 62, n° 1, pp. 221- 227.

34. MIYAGI S.J., *et al.* Developmental changes in hepatic antioxidant capacity are age- and sex-dependent. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2009. Vol. 111, n° 4, pp. 440- 445.

35. KRASINSKI S. D., *et al.* Relationship of vitamin A and vitamin E intake to fasting plasma retinol, retinol-binding protein, retinyl esters, carotene, alpha-tocopherol, and cholesterol among elderly people and young adults: increased plasma retinyl esters among vitamin A-supplement users. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1989. Vol. 49, n° 1, pp.

36. AL-AZEMI M.K., *et al.* Factors contributing to gender differences in serum retinol and α -tocopherol in infertile couples. *Reproductive BioMedicine Online*. 2009. Vol. 19, n° 4, pp. 583- 590.

37. GUNANTI I.R., *et al.* Low Serum Concentrations of Carotenoids and Vitamin E Are Associated with High Adiposity in Mexican-American Children. *The Journal of Nutrition*. 2014. Vol. 144, n° 4, pp. 489- 495.

38. WALLSTRÖM P., *et al.* Serum concentrations of β -carotene and α -tocopherol are associated with diet, smoking, and general and central adiposity. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001. Vol. 73, n° 4, pp. 777- 785.

39. ÖHRVALL M., TENGBLAD S. et VESSBY B. Lower tocopherol serum levels in subjects with abdominal adiposity. *Journal of Internal Medicine*. 1993. Vol. 234, n° 1, pp. 53- 60.

40. SHAH A.A., *et al.* Effect of smoking on serum xanthine oxidase, malondialdehyde, ascorbic acid and α -tocopherol levels in healthy male subjects. *Pakistan journal of medical sciences*. 2015. Vol. 31, n° 1, pp. 146.

41. DUTHIE G. G., *et al.* Effects of smoking and vitamin E on blood antioxidant status. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1991. Vol. 53, n° 4, pp. 1061S-1063S.

42. MEZZETTI A., *et al.* Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers - ScienceDirect. *Atherosclerosis*. 1995. Vol. 112, n° 1, pp. 91- 99.

43. BJØRNEBO E., *et al.* Reduced hepatic α -tocopherol content after long-term administration of ethanol to rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1987. Vol. 918, n° 3, pp. 236- 241.

44. DORING F., *et al.* In Silico Search for Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Important in Vitamin E Homeostasis. *IUBMB life*. 2004. Vol. 56, n° 10, pp. 615- 620.

45. BOREL P., *et al.* Can Genetic Variability in α -Tocopherol Bioavailability Explain the Heterogeneous Response to α -Tocopherol Supplements? *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014. Vol. 22, n° 8, pp. 669- 678.

46. BOREL P., *et al.* Human Plasma Levels of Vitamin E and Carotenoids Are Associated with Genetic Polymorphisms in Genes Involved in Lipid Metabolism. *The Journal of Nutrition*. 1 décembre 2007. Vol. 137, n° 12, pp. 2653- 2659.

47. MAJOR J., *et al.* Genome-wide association study identifies common variants associated with circulating vitamin E levels. *Human molecular genetics*. 2011. Vol. 20, n° 19, pp. 3876- 3883.
48. BOREL P., *et al.* Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2001. Vol. 280, n° 1, pp. G95- G103.
49. SENIOR J. R., *et al.* Intestinal absorption of fats. *Journal of Lipid Research*. 1964. Vol. 5, n° 4, pp. 495- 521.
50. MATTSON F. H. et VOLPENHEIN R. A. The Digestion and Absorption of Triglycerides. *Journal of Biological Chemistry*. 1964. Vol. 239, n° 9, pp. 2772- 2777. F. H. Mattson, R. A. Volpenhein
51. BOSCH H., *et al.* On the positional specificity of phospholipase A from pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1965. Vol. 98, n° 3, pp. 657- 659.
52. MCINTYRE N. Cholesterol Absorption. *Lipid Absorption: Biochemical and Clinical Aspects*. 1976. pp. 73- 84.
53. LAURIDSEN C., *et al.* Hydrolysis of tocopheryl and retinyl esters by porcine carboxyl ester hydrolase is affected by their carboxylate moiety and bile acids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2001. Vol. 12, n° 4, pp. 219- 224.
54. WESTERGAARD H. et DIETSCHY J. M. The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. *The Journal of Clinical Investigation*. 1976. Vol. 58, n° 1, pp. 97- 108.
55. SHIAU Y. F., *et al.* Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1985. Vol. 248, n° 6, pp. G608- G617.
56. KAMP F. et HAMILTON J. A. pH gradients across phospholipid membranes caused by fast flip-flop of un-ionized fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992. Vol. 89, n° 23, pp. 11367- 11370.
57. ABUMRAD N., *et al.* Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1999. Vol. 1441, n° 1, pp. 4- 13.
58. GLATZ J. F. C. et VUSSE, G. J. Cellular fatty acid-binding proteins: current concepts and future directions. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1990. Vol. 98, n° 1- 2, pp. 237- 251.
59. POHL J., *et al.* Role of FATP in parenchymal cell fatty acid uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2004. Vol. 1686, n° 1- 2, pp. 1- 6.
60. FEBBRAIO M., *et al.* CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001. Vol. 108, n° 6, pp. 785- 791.
61. ORAM J. F. et VAUGHAN A. M. ATP-Binding Cassette Cholesterol Transporters and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*. 2006. Vol. 99, n° 10, pp. 1031- 1043.

62. DAVIS H. R., *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) Is the Intestinal Phytosterol and Cholesterol Transporter and a Key Modulator of Whole-body Cholesterol Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004. Vol. 279, n° 32, pp. 33586- 33592.
63. REBOULE E., *et al.* Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006. Vol. 281, n° 8, pp. 4739- 4745.
64. ANWAR K., KAYDEN H. J. et HUSSAIN M. M. Transport of vitamin E by differentiated Caco-2 cells. *Journal of Lipid Research*. 2006. Vol. 47, n° 6, pp. 1261- 1273.
65. ZIMMER S., *et al.* A novel human Tocopherol-Associated Protein cloning, in vitro expression, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275, n° 33, pp. 25672- 25680.
66. MANOR D. et ATKINSON J. Is tocopherol associated protein a misnomer? *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2003. Vol. 14, n° 7, pp. 421- 422; author reply 423.
67. HAVEL R. J., *et al.* The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *Journal of Clinical Investigation*. 1955. Vol. 34, n° 9, pp. 1345- 1353.
68. HUSSAIN M. M., *et al.* Chylomicron assembly and catabolism: role of Apolipoproteins and Receptors. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1996. Vol. 1300, n° 3, pp. 151- 170.
69. HUSSAIN M. M. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*. 2000. Vol. 148, n° 1, pp. 1- 15.
70. WETTERAU J. R. *et al.* A Triglyceride and Cholesteryl Ester Transfer Protein associated with liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*. 1984. Vol. 259, n° 17, pp. 10863- 10866.
71. TANG B. L., *et al.* A Membrane Protein Enriched in Endoplasmic Reticulum Exit Sites Interacts with COPII. *Journal of Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276, n° 43, pp. 40008- 40017.
72. JENSEN D. et SCHEKMAN R. COPII-mediated vesicle formation at a glance. *Journal of Cell Science*. 2011. Vol. 124, n° 1, pp. 1- 4.
73. PUCADYIL T. J. et SCHMID S. L. Conserved functions of membrane active GTPases in coated vesicle formation. *Science*. 2009. Vol. 325, n° 5945, pp. 1217- 1220.
74. WEISSMAN J. T., *et al.* The Mammalian Guanine Nucleotide Exchange Factor mSec12 is Essential for Activation of the Sar1 GTPase Directing Endoplasmic Reticulum Export. *Traffic*. 2001. Vol. 2, n° 7, pp. 465- 475.
75. LEE M. et MILLER E. A. Molecular mechanisms of COPII vesicle formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2007. Vol. 18, n° 4, pp. 424- 434.
76. SIDDIQI S. A., *et al.* COPII proteins are required for Golgi fusion but not for Endoplasmic Reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *Journal of Cell Science*. 2003. Vol. 116, n° 2, pp. 415- 427.
77. NEELI I., *et al.* Liver Fatty Acid-binding Protein Initiates Budding of Pre-chylomicron Transport Vesicles from Intestinal Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Vol. 282, n° 25, pp. 17974- 17984.

78. HUSSAIN M. M., *et al.* Intestinal lipoprotein assembly. *Current Opinion in Lipidology*. 2005. Vol. 16, n° 3, pp. 281. DOI 10.1097/01.mol.0000169347.53568.5a.
79. ARITA M., *et al.* α -Tocopherol transfer protein stimulates the secretion of α -tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A-insensitive pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. Vol. 94, n° 23, pp. 12437- 12441.
80. ORAM J. F., *et al.* ATP-binding Cassette Transporter A1 Mediates Cellular Secretion of α -Tocopherol. *Journal of Biological Chemistry*. 2001. Vol. 276, n° 43, pp. 39898- 39902.
81. ORSÓ E., *et al.* Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abc1 -deficient mice. *Nature Genetics*. 2000. Vol. 24, n° 2, pp. 192- 196.
82. IQBAL J. et HUSSAIN M. M. Evidence for multiple complementary pathways for efficient cholesterol absorption in mice. *Journal of Lipid Research*. 2005. Vol. 46, n° 7, pp. 1491- 1501.
83. REBOUL E., *et al.* ATP-binding cassette transporter A1 is significantly involved in the intestinal absorption of α - and γ -tocopherol but not in that of retinyl palmitate in mice. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2009. Vol. 89, n° 1, pp. 177- 184
84. OLIVIER M., *et al.* ABCG1 is involved in Vitamin E efflux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2014. Vol. 1841, n° 12, pp. 1741- 1751.
85. BIERI J. G., *et al.* Reduced Intestinal Absorption of Vitamin E by Low Dietary Levels of Retinoic Acid in Rats. *The Journal of Nutrition*. 1981. Vol. 111, n° 3, pp. 458- 467.
86. RICHELLE M., *et al.* Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of β -carotene and α -tocopherol in normocholesterolemic humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004. Vol. 80, n° 1, pp. 171- 177.
87. BJØRNEBOE A., *et al.* Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E. *The Journal of Nutrition*. 1990. Vol. 120, n° 3, pp. 233- 242.
88. DOIK., *et al.* Influence of Dietary Fiber (Konjac Mannan) on Absorption of Vitamin B12 and Vitamin E. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 1983. Vol. 141, n° Suppl, pp. 677- 681.
89. SATO Y., *et al.* Primary structure of alpha-tocopherol transfer protein from rat liver. Homology with cellular retinaldehyde-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993. Vol. 268, n° 24, pp. 17705- 17710.
90. HOSOMI, A., *et al.* Affinity for α -Tocopherol Transfer Protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS letters*. 1997. Vol. 409, n° 1, pp. 105- 108.
91. ULATOWSKI L. et MANOR D. Vitamin E trafficking in neurologic health and disease. *Annual Review of Nutrition*. 2013. Vol. 33, pp. 87- 103.
92. LETH T. et SONDERGAARD H. Biological activity of vitamin E compounds and natural materials by the resorption-gestation test, and chemical determination of the vitamin E activity in foods and feeds. *The Journal of Nutrition*. 1977. Vol. 107, n° 12, pp. 2236- 2243.
93. TRABER M. G., BURTON G. W. et HAMILTON R. L. Vitamin E trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004. Vol. 1031, pp. 1- 12.

94. QIAN J., *et al.* Intracellular trafficking of vitamin E in hepatocytes: the role of tocopherol transfer protein. *Journal of Lipid Research*. 2005. Vol. 46, n° 10, pp. 2072- 2082.
95. TRABER M. G., *et al.* Human plasma vitamin E kinetics demonstrate rapid recycling of plasma RRR- α -tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. Vol. 91, n° 21, pp. 10005- 10008.
96. RIGOTTI A. Absorption, Transport, and Tissue delivery of Vitamin E. *Molecular Aspects of Medicine*. 2007. Vol. 28, n° 5- 6, pp. 423- 436.
97. GALLI F. et POLIDORI M. C. Vitamin E Biotransformation in Humans. *Vitamins & Hormones*. 2007. Vol. 76, pp. 263- 280.
98. ZHAO Y., *et al.* Analysis of multiple metabolites of tocopherols and tocotrienols in mice and humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 58, n° 8, pp. 4844- 4852.
99. SONTAG T. J. et PARKER R. S. Cytochrome P450 ω -Hydroxylase Pathway of Tocopherol Catabolism: Novel mechanism of regulation of vitamin E status. *Journal of Biological Chemistry*. 2002. Vol. 277, n° 28, pp. 25290- 25296.
100. JOHNSON C., *et al* Novel metabolites and roles for α -tocopherol in humans and mice discovered by mass spectrometry-based metabolomics-. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2012. Vol. 96, n° 4, pp. 818- 830.
101. KOLLECK I., *et al.* HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. Vol. 27, n° 7- 8, pp. 882- 890.
102. BJØRNEBOE A. *et al.* Transport and distribution of α -tocopherol in lymph, serum and liver cells in rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 19 décembre 1986. Vol. 889, n° 3, pp. 310- 315.
103. HACQUEBARD M., *et al.* Vitamin E: absorption, plasma transport and cell uptake. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 2005. Vol. 8, n° 2, pp. 133.
104. TRABER M. G. Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *Journal of Lipid Research*. 2013. Vol. 54, n° 9, pp. 2295- 2306.
105. GOTI D., *et al.* Uptake of lipoprotein-associated α -tocopherol by primary porcine brain capillary endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*. 2000. Vol. 74, n° 4, pp. 1374- 1383.
106. TRABER M. G., *et al.* Studies on the transfer of tocopherol between lipoproteins. *Lipids*. 1992. Vol. 27, n° 9, pp. 657- 663.
107. KOSTNER G. *et al.* Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of α -tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochemical Journal*. 1995. Vol. 305, n° 2, pp. 659- 667.
108. JIANG Q., *et al.* Analysis of vitamin E metabolites including carboxychromanols and sulfated derivatives using LC/MS/MS. *Journal of Lipid Research*. 2015. Vol. 56, n° 11, pp. 2217- 2225.
109. YOKOGAWA K., *et al.* Disposition kinetics of α -tocopherol in apolipoprotein B knockout mice. *Pharmaceutical Research*. 2003. Vol. 20, n° 3, pp. 368- 372. =

110. MARDONES P., *et al.* α -Tocopherol Metabolism Is Abnormal in Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI)-Deficient Mice. *The Journal of Nutrition*. 2002. Vol. 132, n° 3, pp. 443- 449.
111. TAKADA T. et SUZUKI H. Molecular mechanisms of membrane transport of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2010. Vol. 54, n° 5, pp. 616- 622.
112. MUSTACICH D. Biliary Secretion of α -Tocopherol and the Role of the mdr2 P-Glycoprotein in Rats and Mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998. Vol. 350, n° 2, pp. 183- 192.
113. ZHOU C. Tocotrienols activate the steroid and xenobiotic receptor, SXR, and selectively regulate expression of its target genes. 2004. Vol. 32, n° 10, pp. 1075--1082.
114. SIES H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997. Vol. 82, n° 2, pp. 291- 295.
115. FAVIER A. Le stress oxydant : intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur. *Annales de Biologie Clinique*. 1997. Vol. 55, n° 1, pp. 9- 16.
116. BURTON G.W., *et al.* First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *The Lancet*. 1982. Vol. 320, n° 8293, pp. 327.
117. VAN GOSSUM A. Decrease in lipid peroxidation measured by breath pentane output in normals after oral supplementation with vitamin E. *Clinical Nutrition*. 1988. Vol. 7, n° 1, pp. 53- 57.
118. BUETTNER G. R. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, and Ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993. Vol. 300, n° 2, pp. 535- 543.
119. PACKER L. Protective role of vitamin E in biological systems. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1991. Vol. 53, n° 4, pp. 1050S-1055S.
120. PAROLA M., *et al.* Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride—induced chronic liver damage and cirrhosis. *Hepatology*, 1992, vol. 16, no 4, p. 1014-1021.
121. KAMAL- ELDIN A. et APPELQVIST L-Å. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*. 1996. Vol. 31, n° 7, pp. 671- 701.
122. COONEY R. *et al.* Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993. Vol. 90, n° 5, pp. 1771- 1775.
123. CHRISTEN S., *et al.* gamma-tocopherol traps mutagenic electrophiles such as NO(X) and complements alpha-tocopherol: physiological implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997. Vol. 94, n° 7, pp. 3217- 3222.
124. COONEY R. V., *et al.* Products of gamma-tocopherol reaction with NO₂ and their formation in rat insulinoma (RINm5F) cells. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995. Vol. 19, n° 3, pp. 259- 269.
125. PRUTHI S., *et al.* Vitamin E Supplementation in the Prevention of Coronary Heart Disease. *Mayo Clinic Proceedings*. 2001. Vol. 76, n° 11, pp. 1131- 1136.

126. WILLIAMS J. C., *et al.* Dietary vitamin E supplementation inhibits thrombin-induced platelet aggregation, but not monocyte adhesiveness, in patients with hypercholesterolaemia. *International Journal of Experimental Pathology*. 1997. Vol. 78, n° 4, pp. 259- 266.
127. TEUPSER D., *et al.* α -Tocopherol down-regulates scavenger receptor activity in macrophages. *Atherosclerosis*. 1999. Vol. 144, n° 1, pp. 109- 115.
128. DEVARAJ S., *et al.* α -Tocopherol decreases CD36 expression in human monocyte-derived macrophages. *Journal of Lipid Research*. 2001. Vol. 42, n° 4, pp. 521- 527.
129. OZER N.K., *et al.* Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*. 2006. Vol. 184, n° 1, pp. 15- 20. DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2005.03.050.
130. RICCIARELLI R., *et al.* Vitamin E Reduces the Uptake of Oxidized LDL by Inhibiting CD36 Scavenger Receptor Expression in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells. *Circulation*. 2000. Vol. 102, n° 1, pp. 82- 87.
131. TANG F., *et al.* Vitamin E Conditionally Inhibits Atherosclerosis in ApoE Knockout Mice by Anti-oxidation and Regulation of Vasculature Gene Expressions | SpringerLink. *Lipids*. 2014. Vol. 49, n° 12, pp. 1215- 1223.
132. BOZAYKUTP., *et al.* Effects of vitamin E on peroxisome proliferator-activated receptor γ and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 in hypercholesterolemia-induced atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014. Vol. 70, pp. 174- 181.
133. VILLACORTAL., *et al.* α -Tocopherol Induces Expression of Connective Tissue Growth Factor and Antagonizes Tumor Necrosis Factor- α -Mediated Downregulation in Human Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*. 2003. Vol. 92, n° 1, pp. 104- 110.
134. ARATRI E., *et al.* Modulation of α -tropomyosin expression by α -tocopherol in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters*. 1999. Vol. 447, n° 1, pp. 91- 94.
135. LANDRIER J.F., *et al.* Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2010. Vol. 21, n° 12, pp. 1207- 1213.
136. OZER N. K. d- α -Tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein kinase C activity in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters*. 1993. Vol. 322, n° 3, pp. 307- 310.
137. DEVARAJ S., *et al.* The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Decreased lipid oxidation, interleukin 1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium. *The Journal of Clinical Investigation*. 1 août 1996. Vol. 98, n° 3, pp. 756- 763.
138. CACHIA O., *et al.* α -Tocopherol Inhibits the Respiratory Burst in Human Monocytes ATTENUATION OF p47 phox MEMBRANE TRANSLOCATION AND PHOSPHORYLATION. *Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273, n° 49, pp. 32801- 32805.
139. KOYA D., *et al.* Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-alpha-tocopherol. *Journal of the American Society of Nephrology*. 1997. Vol. 8, n° 3, pp. 426- 435.

140. RICCIARELLI R., *et al.* Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by α -tocopherol via Protein Kinase C inhibition. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999. Vol. 27, n° 7- 8, pp. 729- 737.
141. DEVARAJ S. et JIALAL I. α -Tocopherol Decreases Interleukin-1 β Release From Activated Human Monocytes by Inhibition of 5-Lipoxygenase | Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1999. Vol. 19, n° 4, pp. 1125- 1133.
142. YOSHIKAWA T., *et al.* α - tocopherol protects against expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. 1998. Vol. 7, n° 1,2, pp. 15- 19.
143. AZZI A., *et al.* Vitamin E: a sensor and an information transducer of the cell oxidation state. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1995. Vol. 62, n° 6, pp. 1337S-1346S.
144. FREEDMAN J., *et al.* α -Tocopherol Inhibits Aggregation of Human Platelets by a Protein Kinase C–Dependent Mechanism. *Circulation*. 1996. Vol. 94, n° 10, pp. 2434- 2440.
145. SALDEEN T., *et al.* Differential effects of α - and γ -tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999. Vol. 34, n° 4, pp. 1208- 1215.
146. ISLAM K.N., *et al.* α -Tocopherol Enrichment of Monocytes Decreases Agonist-Induced Adhesion to Human Endothelial Cells. *Circulation*. 1998. Vol. 98, n° 21, pp. 2255- 2261.
147. MARTIN A., *et al.* Vitamin E Inhibits Low-Density Lipoprotein–Induced Adhesion of Monocytes to Human Aortic Endothelial Cells In Vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1997. Vol. 17, n° 3, pp. 429- 436.
148. SCHWENKE D.C., *et al.* α -Tocopherol protects against diet induced atherosclerosis in New Zealand white rabbits. *Journal of Lipid Research*. 2002. Vol. 43, n° 11, pp. 1927- 1938.
149. GISSI-PREVENZIONE INVESTIGATORS AND OTHERS. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet (London, England)*. 1999. Vol. 354, n° 9177, pp. 447- 455.
150. LONN E. *et al.* HOPE STUDY et MICRO-HOPE STUDY. Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care*. 2002. Vol. 25, n° 11, pp. 1919- 1927.
151. STEPHENS N. G., *et al.* Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet (London, England)*. 1996. Vol. 347, n° 9004, pp. 781- 786.
152. WEN Y. et LEAKE D. S. Low density lipoprotein undergoes oxidation within lysosomes in cells. *Circulation Research*. 2007. Vol. 100, n° 9, pp. 1337- 1343.
153. ALBOAKLAH H. K. M. et LEAKE D. S. Effect of vitamin E on low density lipoprotein oxidation at lysosomal pH. *Free Radical Research*. 2020. pp. 1- 11.
154. DALIA A. M., *et al.* Effects of vitamin E, inorganic selenium, bacterial organic selenium, and their combinations on immunity response in broiler chickens. *BMC Veterinary Research*. 2018. Vol. 14, n° 1, pp. 1- 10.
155. WANG L., *et al.* High concentration of vitamin E supplementation in sow diet during the last week of gestation and lactation affects the immunological variables and antioxidative

parameters in piglets | Journal of Dairy Research | Cambridge Core. *Journal of Dairy Research*. 2017. Vol. 84, n° 1, pp. 8- 13.

156. O'BRIEN T., *et al.* Moderate dietary supplementation with vitamin E enhances lymphocyte functionality in the adult cat. *Research in Veterinary Science*. 2015. Vol. 99, pp. 63- 69.

157. REN Z., *et al.* Dietary Supplementation with Tocotrienols Enhances Immune Function in C57BL/6 Mice. Vol. 140, n° 7, pp. 1335- 1341.

158. MAHALINGAM D., *et al.* Effects of supplementation with tocotrienol-rich fraction on immune response to tetanus toxoid immunization in normal healthy volunteers. *European journal of clinical nutrition*. 2011. Vol. 65, n° 1, pp. 63- 69.

159. MEYDANI S., *et al.* Vitamin E Supplementation and In Vivo Immune Response in Healthy Elderly Subjects: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 1997. Vol. 277, n° 17, pp. 1380- 1386.

160. WU D., *et al.* Effect of concomitant consumption of fish oil and vitamin E on T cell mediated function in the elderly: a randomized double-blind trial. *Journal of the American College of Nutrition*. 2006. Vol. 25, n° 4, pp. 300- 306.

161. COOK-MILLS J. M., *et al.* Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2010. Vol. 15, n° 6, pp. 1607- 1638.

162. BERDNIKOVS S. *et al.* Isoforms of Vitamin E Have Opposing Immunoregulatory Functions during Inflammation by Regulating Leukocyte Recruitment. *The Journal of Immunology*. 2009. Vol. 182, n° 7, pp. 4395- 4405.

163. MEYDANI S.N., *et al.* Vitamin E and immune response in the aged: molecular mechanisms and clinical implications. *Immunological Reviews*. 2005. Vol. 205, n° 1, pp. 269- 284.

164. SOKOL R. J. Vitamin E Deficiency and Neurologic Disease. *Annual Review of Nutrition*. 1988. Vol. 8, n° 1, pp. 351- 373.

165. ULATOWSKI L., *et al.* Vitamin E is essential for Purkinje neuron integrity. *Neuroscience*. 2014. Vol. 260, pp. 120- 129.

166. PAPPENHEIMER A., *et al.* A Cerebellar Disorder in Chicks, Apparently of Nutritional Origin. *Journal of Experimental Medicine*. 1931. Vol. 53, n° 1, pp. 11- 26.

167. GOETTSCHE M., *et al.* Nutritional Muscular Dystrophy in the Guinea Pig and Rabbit. *Journal of Experimental Medicine*. 1931. Vol. 54, n° 2, pp. 145- 165.

168. PENTSCHEW A. et SCHWARZ K. Systemic axonal dystrophy in vitamin E deficient adult rats. *Acta Neuropathologica*. 1962. Vol. 1, n° 4, pp. 313- 334.

169. TOWFIGHI J. Effects of chronic vitamin E deficiency on the nervous system of the rat. *Acta Neuropathologica*. 1981. Vol. 54, n° 4, pp. 261- 267.

170. SUNG J.H., *et al.* Axonal Dystrophy in the Gracile Nucleus in Congenital Biliary Atresia and Cystic Fibrosis (Mucoviscidosis): Beneficial Effect of Vitamin E Therapy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 1980. Vol. 39, n° 5, pp. 584- 597..

171. MULLER D.P., *et al.* Long-term management of abetalipoproteinaemia. Possible role for vitamin E. *Archives of Disease in Childhood*. 1977. Vol. 52, n° 3, pp. 209- 214.
172. HARDING A. E., *et al.* Spinocerebellar degeneration secondary to chronic intestinal malabsorption: A vitamin E deficiency syndrome. *Annals of Neurology*. 1982. Vol. 12, n° 5, pp. 419- 424.
173. HAMEL J. et LOGIGIAN E. L. The clinical spectrum of acute nutritional axonal neuropathy (ANAN) (S42.009). *Neurology*. 2019. Vol. 92, n° 15 Supplement, pp. S42.009.
174. YOKOTA T., *et al.* Adult- onset spinocerebellar syndrome with idiopathic vitamin E deficiency. *Annals of neurology*, 1987, vol. 22, no 1, p. 84-87.
175. JEANDEL C., *et al.* Lipid Peroxidation and Free Radical Scavengers in Alzheimer's Disease. *Gerontology*. 1989. Vol. 35, n° 5- 6.
176. MORRIS M. C., *et al.* Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of incident Alzheimer disease. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 1998. Vol. 12, n° 3, pp. 121- 126.
177. ENGELHART M. J., *et al.* Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease. *Jama*, 2002, vol. 287, no 24, p. 3223-3229
178. MORRIS M. C. Dietary intake of antioxidant nutrients and the risk of incident Alzheimer disease in a biracial community study. *Journal of the American Medical Association*. 2002. Vol. 287, n° 24, pp. 3230- 3237.
179. ZANDI P., *and al.* Reduced risk of Alzheimer disease in users of antioxidant vitamin supplements: The Cache County Study. *Archives of neurology*. 2004. Vol. 61, n° 1, pp. 82- 88.
180. BASAMBOMBO L., *et al.* Use of Vitamin E and C Supplements for the Prevention of Cognitive Decline. *The Annals of Pharmacotherapy*. 2017. Vol. 51, n° 2, pp. 118- 124.
181. GRAY S., *et al.* Antioxidant vitamin supplement use and risk of dementia or Alzheimer's disease in older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2008. Vol. 56, n° 2, pp. 291- 295.
182. MASAKI K. H., *et al.* Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology*. 28 mars 2000. Vol. 54, n° 6, pp. 1265- 1272.
183. LUCHSINGER J. A., *et al.* Antioxidant vitamin intake and risk of Alzheimer disease. *Archives of Neurology*. 2003. Vol. 60, n° 2, pp. 203- 208.
184. BASSEN F. A. et KORNZWEIG A. L. Malformation of the erythrocytes in a case of atypical retinitis pigmentosa. *Blood*, 1950, vol. 5, no 4, p. 381-387.
185. BURNETT J.R., *et al.* Abetalipoproteinemia. In : (éd.), *GeneReviews®*. Seattle (WA) : University of Washington, Seattle, 1993. NBK532447
186. REHBERG E.F., *et al.* A novel abetalipoproteinemia genotype : Identification of a missense mutation in the 97-kDa subunit of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein that prevents complex formation with Protein Disulfide Isomerase. *Journal of Biological Chemistry*. 1996. Vol. 271, n° 47, pp. 29945- 29952.
187. WETTERAU J. R., *et al.* Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia. *Science*. 1992. Vol. 258, n° 5084, pp. 999- 1001.

188. FISHER E.A., *et al.* The Degradation of Apolipoprotein B100 Is Mediated by the Ubiquitin-proteasome Pathway and Involves Heat Shock Protein 70. *Journal of Biological Chemistry*. 1997. Vol. 272, n° 33, pp. 20427- 20434.
189. KANE J.P., *et al.* Disorders of the biogenesis and secretion of lipoproteins containing the B Apolipoproteins. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 1995.
190. BERRIOT-VAROQUEAUX N., *et al.* The Role of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Abetalipoproteinemia. *Annual Review of Nutrition*. 2000. Vol. 20, n° 1, pp. 663- 697.
191. BERRIOT-VAROQUEAUX N., *et al.* [Microsomal triglyceride transfer protein and abetalipoproteinemia]. *Annales d'endocrinologie*. mai 2000. Vol. 61, n° 2, pp. 125- 129.
192. DELPRE G., *et al.* Endoscopic assessment in abetalipoproteinemia (Bassen-Kornzweig-syndrome). *Endoscopy*. 1978. Vol. 10, n° 1, pp. 59- 62.
193. PERETTI N. *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of chylomicron retention disease based on a review of the literature and the experience of two centers. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2010. Vol. 5, n° 1, pp. 24.
194. BLACK D. *et al.* Intestinal and hepatic apolipoprotein B gene expression in abetalipoproteinemia. *Gastroenterology*. 1991. Vol. 101, n° 2, pp. 520- 528.
195. BRAEGGER C. P., *et al.* Persistence of the intestinal defect in abetalipoproteinaemia after liver transplantation. *European Journal of Pediatrics*. 1998. Vol. 157, n° 7, pp. 576- 578. DOI 10.1007/s004310050882.
196. TANYEL M. C. et MANCANO L. D. Neurologic findings in vitamin E deficiency. *American Family Physician*. 1997. Vol. 55, n° 1, pp. 197- 201.
197. HEGELE R. A. et ANGEL A. Arrest of neuropathy and myopathy in abetalipoproteinemia with high-dose vitamin E therapy. *Canadian Medical Association Journal*. 1985. Vol. 132, n° 1, pp. 41- 44.
198. CHOWERS I. *et al.* Long-term assessment of combined vitamin A and E treatment for the prevention of retinal degeneration in abetalipoproteinaemia and hypobetalipo-proteinaemia patients. *Eye*. 2001. Vol. 15, n° 4, pp. 525- 530.
199. LEE J. et HEGELE R. A. Abetalipoproteinemia and homozygous hypobetalipoproteinemia: a framework for diagnosis and management. *Journal of inherited metabolic disease*. 2014. Vol. 37, n° 3, pp. 333–339.
200. DISCHE M. R. et PORRO R. S. The cardiac lesions in Bassen-Kornzweig syndrome: report of a case, with autopsy findings. *The American journal of medicine*, 1970, vol. 49, no 4, p. 568-571.
201. LACAILLE F., *et al.* [Anderson's disease. Clinical and morphologic study of 7 cases]. *Archives francaises de pediatrie*. 1989. Vol. 46, n° 7, pp. 491- 498.
202. MIGNARD S., *et al.* A severely disturbed lipid profile. In : *Annales de Biologie Clinique*. 2004. pp. 330–333.
203. COOPER D. et CHEN J.-M. *Mutations in Human Genetic Disease*. BoD – Books on Demand, 2012. ISBN 978-953-51-0790-3.

204. KAYDEN H. J., *et al.* The role of vitamin E deficiency in the abnormal autohemolysis of acanthocytosis. *Transactions of the Association of American Physicians*. 1965. Vol. 78, pp. 334- 342.
205. OKADA T., *et al.* Anderson's disease/chylomicron retention disease in a Japanese patient with uniparental disomy 7 and a normal SAR1B gene protein coding sequence. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2011. Vol. 6, pp. 78.
206. LEVY E., *et al.* Intestinal apoB synthesis, lipids, and lipoproteins in chylomicron retention disease. *Journal of Lipid Research*. 1987. Vol. 28, n° 11, pp. 1263- 1274.
207. SANÉ A., *et al.* New Insights In Intestinal Sar1B GTPase Regulation and Role in Cholesterol Homeostasis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2015. Vol. 116, n° 10, pp. 2270- 2282.
208. NAKANO A. et MURAMATSU M. A novel GTP-binding protein, Sar1b, is involved in transport from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi Apparatus. *The Journal of cell biology*. 1989. Vol. 109, n° 6, pp. 2677–2691.
209. FROMME J. *et al.* The genetic basis of a craniofacial disease provides insight into COPII coat assembly. *Developmental Cell*. 2007. Vol. 13, n° 5, pp. 623- 634.
210. ANDERSON C. M., *et al.* Unusual causes of steatorrhea in infancy and childhood. *The Medical Journal of Australia*. 1961. Vol. 48(2), pp. 617- 622.
211. DANNOURA A. H., *et al.* Anderson's disease: exclusion of apolipoprotein and intracellular lipid transport genes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1999. Vol. 19, n° 10, pp. 2494- 2508.
212. ROY C. C., *et al.* Malabsorption, hypocholesterolemia, and fat-filled enterocytes with increased intestinal apoprotein B. Chylomicron retention disease. *Gastroenterology*. 1987. Vol. 92, n° 2, pp. 390- 399.
213. SEGAL S. et SHARMA S. Ophthalmic problem. Vitamin A and vitamin E. *Canadian Family Physician Medecin De Famille Canadien*. 2005. Vol. 51, pp. 1079, 1085- 1086.
214. RUNGE P., *et al.* Oral vitamin E supplements can prevent the retinopathy of abetalipoproteinemia. *British Journal of Ophthalmology*. 1986. Vol. 70, n° 3, pp. 166- 173.
215. CHEN M., *et al.* Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 2001. Vol. 281, n° 5, pp. E916-923.
216. SILVAIN M., *et al.* Anderson's disease (chylomicron retention disease): a new mutation in the SARA2 gene associated with muscular and cardiac abnormalities. *Clinical Genetics*. 2008. Vol. 74, n° 6, pp. 546- 552.
217. BERRIOT-VAROQUEAUX N., *et al.* Apolipoprotein B48 glycosylation in abetalipoproteinemia and Anderson's disease. *Gastroenterology*. 2001. Vol. 121, n° 5, pp. 1101- 1108.
218. BOUMA M. E., *et al.* Hypobetalipoproteinemia with accumulation of an apoprotein B-like protein in intestinal cells. Immunochemical and biochemical characterization of seven cases of Anderson's disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 1986. Vol. 78, n° 2, pp. 398- 410.

219. SCHONFELD G. Familial hypobetalipoproteinemia: A Review. *Journal of Lipid Research*. 2003. Vol. 44, n° 5, pp. 878- 883.
220. BURNETT J. R., *et al.* Clinical utility gene card for: Abetalipoproteinaemia. *European journal of human genetics: EJHG*. 2012. Vol. 20, n° 8. DOI 10.1038/ejhg.2012.30.
221. TARUGI P., *et al.* A study of fatty liver disease and plasma lipoproteins in a kindred with Familial Hypobetalipoproteinemia due to a novel truncated form of Apolipoprotein B (APO B-54.5). *Journal of hepatology*. 2000. Vol. 33, n° 3, pp. 361–370.
222. MULLER D. P., *et al.* The role of vitamin E in the treatment of the neurological features of abetalipoproteinaemia and other disorders of fat absorption. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1985. Vol. 8 Suppl 1, pp. 88- 92.
223. ZAMEL R., *et al.* Abetalipoproteinemia: Two case reports and literature review. *Orphanet journal of rare diseases*. 2008. Vol. 3, n° 1, pp. 19.
224. VATASSERY G., *et al.* Alpha-Tocopherol in CSF of subjects taking high-dose vitamin E in the DATATOP study. *Neurology*. 1998. Vol. 50, n° 6, pp. 1900–1902.
225. BISHARA S., *et al.* Combined vitamin A and E therapy prevents retinal electrophysiological deterioration in abetalipoproteinaemia. *British Journal of Ophthalmology*. 1982. Vol. 66, n° 12, pp. 767- 770.
226. GAUDET L., *et al.* Fat-soluble vitamin deficiency in pregnancy: a case report and review of abetalipoproteinemia. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada: JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada: JOGC*. 2006. Vol. 28, n° 8, pp. 716- 719.
227. ILLINGWORTH D. R., *et al.* Abetalipoproteinemia: Report of two cases and review of therapy. *Archives of Neurology*. 1980. Vol. 37, n° 10, pp. 659- 662.
228. CUERQ C., *et al.* Establishment of reference values of α -tocopherol in plasma, red blood cells and adipose tissue in healthy children to improve the management of chylomicron retention disease, a rare genetic hypocholesterolemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2016. Vol. 11, n° 1, pp. 114.
229. CALZADA C., *et al.* Inhibitory effects of in vivo oxidized high-density lipoproteins on platelet aggregation: evidence from patients with abetalipoproteinemia. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013. Vol. 27, n° 7, pp. 2855- 2861.

Enjeux de la supplémentation en vitamine E dans les hypocholestérolémies primaires intestinales et création d'un modèle d'étude

Les hypocholestérolémies primaires intestinales sont un groupe de pathologies héréditaires liées à des mutations sur des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides. Ces mutations sont à l'origine d'un défaut d'assemblage et de sécrétion des lipoprotéines entraînant, dès la période néonatale, une malabsorption intestinale des lipides et des vitamines liposolubles (A, D, E, K). De ce fait, ces pathologies sont caractérisées par des taux de lipides plasmatiques extrêmement bas et des carences profondes en vitamines liposolubles. Or, la vitamine E est un micronutriment majeur impliqué dans le développement du système nerveux ; son absorption et son métabolisme dépendent de la sécrétion des chylomicrons. Ainsi, pour prévenir l'apparition de graves complications neurologiques et rétiniennes en lien avec cette carence, une supplémentation orale en α -tocophérol à fortes doses doit être instaurée dès la petite enfance. Cependant, des études de suivi de ce traitement ont montré que, parmi les quatre vitamines liposolubles seuls les taux sériques en vitamine E restent chroniquement bas. Afin de comprendre l'échec de la supplémentation en vitamine E chez les patients atteints d'hypocholestérolémies primaires intestinales, une première étude d'absorption de la vitamine E sur modèle de souris a été menée. Face à des résultats paradoxaux associant une faible concentration intestinale en vitamine E malgré une importante accumulation de triglycérides dans les tissus intestinaux, nous avons décidé de créer un modèle cellulaire d'hypocholestérolémies primaires afin d'explorer le métabolisme entérocytaire de la vitamine E. Ainsi, une invalidation des gènes impliqués dans ces pathologies a été effectuée sur cellules de carcinome de côlon humain (cellules Caco-2) grâce au système d'édition du génome CRISPR/ Cas9. Après une mise en place du protocole d'invalidation et une caractérisation des modèles cellulaires, les premiers essais d'incubation de vitamine E sur cellules Caco-2 mutées ont montré l'existence d'une absorption de vitamine E inchangée associée à une sécrétion effondrée dans le compartiment basolatéral suggérant une dégradation de vitamine E au niveau cytoplasmique. Des études mécanistiques complémentaires sont actuellement en cours afin de comprendre cette dégradation accélérée intra entérocytaire et ainsi ouvrir possiblement de nouvelles perspectives thérapeutiques pour ces patients.

Issues of vitamin E supplementation in patients with primary hypocholesterolemia and creation of a study model

Primary monogenic hypocholesterolemia represents a group of inherited disorders caused by mutations in genes involved in lipid metabolism. These mutations lead to a defective lipoproteins' assembly and secretion and to lipids and fat-soluble vitamins (A, D, E, K) malabsorption at an early age. As a result, these pathologies are characterized by extremely low plasma lipid levels and deep deficiencies in liposoluble vitamins. Because vitamin E is a major fat-soluble micronutrient involved in nervous system development, its absorption and secretion are normally dependent on chylomicrons. Thus, to prevent, long-term ophthalmological and neurological complications related to this deficiency, oral α -tocopherol supplementation with high dose must be introduced as early as possible during childhood. However, follow-up studies have shown that, among the four fat-soluble vitamins, only vitamin E plasma levels remain chronically low. In order to understand the failure of vitamin E supplementation in patients with primary monogenic hypocholesterolemia, previous studies were performed on a mouse model. Faced with paradoxical results associating a low intestinal concentration of vitamin E despite a significant accumulation of triglycerides in intestinal tissues, we decided to create a cellular model of primary hypocholesterolemia in order to explore vitamin E's metabolism. Thus, a genetic invalidation was performed on human colon carcinoma cells (Caco-2 cells) using the CRISPR / Cas9 genome editing system. After establishment of the protocol and a model characterization, vitamin E assays conducted on mutated Caco-2 cells. These assays showed an unchanged vitamin E absorption associated with a collapsed basolateral secretion, suggesting a cytoplasmic degradation of vitamin E. Further mechanistic studies are currently being carried out to understand this accelerated intra-enterocyte degradation and thus possibly open new therapeutic perspectives for these patients.