

## Régulation de la biosynthèse des acides gras polyinsaturés lors de l'hypertension artérielle associée aux diabètes de type 1 et 2

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 10, Numéro 4, 321-7, JUILLET-AOÛT 2003, FONDAMENTAL

**Auteur(s)** : Céline COMTE, Sandrine BELLENGER, Jérôme BELLENGER, Jean-François MERLIN, Christian TESSIER, Jean-Pierre POISSON, Michel NARCE, .

**Author(s)** : Céline COMTE, Sandrine BELLENGER, Jérôme BELLENGER, Jean-François MERLIN, Christian TESSIER, Jean-Pierre POISSON, Michel NARCE

**Résumé** : Nous avons étudié les effets de l'association des pathologies hypertensive et diabétiques sur la conversion des acides linoléique et alpha-linolénique en acides gras plus longs et plus insaturés. Pour cela, nous avons mis en place deux modèles de rats : le premier combinant hypertension artérielle (HTA) et diabète de type 2, grâce à l'administration d'un régime enrichi en fructose à des rats SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) adultes ; le deuxième combinant HTA et diabète de type 1, induit par une injection de streptozotocine à des rats SHR adultes, traités (STZI) ou non (STZ) à l'insuline. Après mesure de la pression artérielle et de la glycémie au sacrifice des animaux, nous avons déterminé la composition des lipides totaux hépatiques en acides gras, les activités de delta-6 désaturation microsomaux hépatiques ainsi que l'expression du gène codant la delta-6 désaturase. Les résultats de l'expérience 1 mettent en évidence une diminution des teneurs en 18 : 2 n-6 et en produits de désaturation à longue chaîne, chez les animaux du lot fructose. L'activité de delta-6 n-3 désaturation est augmentée significativement, alors que l'expression génique a tendance à diminuer. Dans l'expérience 2, une augmentation de la teneur en 18 : 2 n-6 est observée dans le lot STZ, alors que le lot STZI présente des teneurs semblables à celles des témoins. De plus, les teneurs en 20 : 4 n-6 et 22 : 6 n-3 sont augmentées dans le lot STZI. L'activité delta-6 n-3 désaturante est partiellement inhibée dans le lot STZI, et l'expression génique de la delta-6 désaturase est diminuée dans les deux lots traités. Ces résultats mettent en évidence que l'association de l'HTA et des différentes formes de diabète entraîne des perturbations de la biosynthèse des acides gras polyinsaturés qui sont différentes, voire opposées, selon le type de diabète. Leurs répercussions sur les fonctions biologiques des acides gras polyinsaturés restent à élucider.

**Summary** : We have investigated the effects of the association of hypertension and diabetes mellitus on polyunsaturated fatty acid (PUFA) biosynthesis. Two rat models for these pathologies have been established: a type 2 diabetic hypertensive model by feeding *Spontaneously Hypertensive Rat* (SHR) with a fructose enriched diet ; a type 1 diabetic hypertensive model obtained by streptozotocin injection to SHR, followed (STZI) or not (STZ) by insulin treatment. In the liver gene expression of delta-6 desaturase, microsomal delta-6 desaturase activities and fatty acid composition of total lipids were estimated. In experiment 1 the results show a decrease of linoleic acid (18: 2 n-6) level and of long chain products of desaturation in rats fed on the fructose enriched diet. Delta-6 n-3 desaturase activity was significantly increased, whereas gene expression tended to decrease. In experiment 2 an increase of 18: 2 n-6 level was observed in the STZ group, whereas the STZI group showed the same 18: 2 n-6 level as the control group. Arachidonic and docosahexaenoic acid levels were increased in

the STZI group. Delta-6 n-3 desaturase activity was partly inhibited in the STZI group, when the gene expression is decreased in the 2 experimental groups. These results evidenced that the associated hypertension and diabetes mellitus induced changes in PUFA biosynthesis. These modifications were different, even opposite, according to the type of diabetes. The consequences on biological functions of PUFA remain to be elucidated.

**Mots-clés :** hypertension, diabète, acides gras polyinsaturés, désaturation, expression génique.

**Keywords :** hypertension, diabetes mellitus, PUFA, desaturase, gene expression.

## ARTICLE

**Auteur(s) :** Céline COMTE, Sandrine BELLENGER, Jérôme BELLENGER, Jean-François MERLIN, Christian TESSIER, Jean-Pierre POISSON, Michel NARCE

UPRES Lipides et Nutrition EA 2422, Université de Bourgogne, Faculté des Sciences Gabriel, 6 boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France.

Reçu le 08.01.03

Accepté le 15.05.03

Les acides gras polyinsaturés (AGPI), qui jouent un rôle important dans de nombreuses fonctions biologiques, notamment membranaires, sont des précurseurs de seconds messagers et interviennent dans la régulation de divers gènes du métabolisme lipidique [1].

Dans le foie principalement, les acides linoléique (18 :2 n-6 ; LA) et alpha-linolénique (18 :3 n-3 ; ALA), précurseurs des séries n-6 et n-3, sont convertis respectivement en acide arachidonique (20 :4 n-6 ; AA) et acide éicosapentaénoïque (20 :5 n-3 ; EPA) par des réactions successives de delta-6 désaturation (delta-6 désaturase), d'élongation (élongases) et de delta-5 désaturation (delta-5 désaturase) [2]. La biosynthèse des AGPI dépend de l'apport alimentaire en leurs précurseurs, mais aussi de l'activité des désaturases, enzymes limitantes de cette biosynthèse, qui sont influencées par de nombreux facteurs nutritionnels, hormonaux, physiologiques et géniques [3].

Diverses situations physiopathologiques peuvent perturber le métabolisme des AGPI : en ce qui concerne le diabète de type 1 (diabète insulino-dépendant, DID), des anomalies de leur biosynthèse et de celle des prostanoides, qui en dérivent, ont été mises en évidence [4], la composition en acides gras des membranes microsomaux hépatiques, où sont ancrées les désaturases, étant modifiée [5]. Les activités de désaturation sont également altérées lors de l'induction d'un diabète de type 1 par la streptozotocine (STZ), mais des injections d'insuline restaurent partiellement ces activités [6]. Ces résultats sont confirmés par une diminution importante des taux d'ARNm de la delta-6 désaturase au niveau hépatique [7]. Chez les rats Wistar Bio-Breeding (BB, modèle animal génétique du diabète de type 1), les activités des désaturases sont partiellement inhibées et la composition en acides gras des microsomes

hépatiques reste altérée malgré l'injection régulière d'insuline, nécessaire à la survie des animaux [5, 8].

En revanche, les relations entre biosynthèse des AGPI et diabète de type 2 (diabète non-insulino-dépendant, DNID) ne sont pas établies. Toutefois, il est possible que la biosynthèse des AGPI soit altérée, du fait d'interactions existant entre les métabolismes lipidique et glucidique.

Lors de l'hypertension artérielle (HTA) génétique, des altérations de la biosynthèse des AGPI et de la composition membranaire hépatique en acides gras ont été mises en évidence [9], avec une augmentation des teneurs en acides gras monoinsaturés des membranes microsomiales hépatiques [9] et une diminution des activités désaturantes [10].

L'HTA est plus fréquente chez les diabétiques de type 1 ou de type 2 que chez les non diabétiques. À long terme, les complications de l'HTA combinées avec celles du diabète de type 2 sont conséquentes : athérosclérose, accidents vasculaires cérébraux, complications cardiaques et rénales [11]. Ces données nous ont conduit à étudier l'effet de l'association de ces pathologies sur la biosynthèse des AGPI, les interactions entre le diabète combiné à l'HTA et le métabolisme de ces acides gras étant mal connues.

L'objectif de ce travail est donc de déterminer les effets que peut avoir l'association des pathologies hypertensive et diabétique sur la conversion de LA et ALA en acides gras plus longs et plus insaturés. Pour cela, nous avons mis en place deux modèles de rats : le premier (expérience 1) combine HTA et diabète de type 2, grâce à l'administration d'un régime enrichi en fructose [12] à des rats SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) adultes ; le deuxième (expérience 2) combine HTA et diabète de type 1 - traité ou non avec de l'insuline – grâce à une injection de STZ chez des rats SHR adultes [6]. Après mesure de la pression artérielle et de la glycémie au sacrifice des animaux, nous avons déterminé la composition en acides gras des lipides totaux (LT) hépatiques, les activités delta-6 n-6 et delta-6 n-3 désaturantes microsomiales hépatiques ainsi que l'expression hépatique du gène codant la delta-6 désaturase.

## **Matériel et méthodes**

### ***Animaux et régimes***

Dans l'expérience 1, 8 rats mâles SHR (Iffa-Credo, Domaine des Oncins, L'Arbresle, France), âgés de 10 semaines, sont maintenus en conditions contrôlées de température ( $25 \pm 1$  °C) et d'humidité ( $60 \pm 5$  %), avec un rythme nyctéméral de 12 h. L'eau de boisson leur est apportée *ad libitum* et ils sont nourris avec un régime commercial équilibré (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France, *tableau 1*). Après une semaine d'adaptation, les animaux sont séparés en 2 lots de 4 rats témoins et 4 rats expérimentaux ; ces lots sont alors respectivement nourris pendant 30 semaines soit avec le régime commercial équilibré (lot témoin), soit avec un régime expérimental riche en fructose (UPAE ; lot fructose), dont les compositions sont données dans le *tableau 1*.

**Tableau 1.** Composition (%) en nutriments des régimes témoin et expérimental

Régime témoin	Régime expérimental	
Caséine	20	20
Lipides (a)	12	12
Méthionine	0,3	0,3
Vitamines	1	1
Minéraux	5	5
Amidon	57,2	–
Saccharose	4,5	–
Fructose	–	61,7

a : mélange d'huile ISIO4 Lesieur 3,75 % et d'huile de palme 8,25 %.

Dans l'expérience 2, 12 rats mâles SHR (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France), âgés de 11 semaines, maintenus dans les conditions décrites ci-dessus, sont séparés en 3 lots de 4 animaux. Deux lots reçoivent une injection unique, par voie intra-péritonéale, de STZ (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France), à raison de 75 mg par kg de poids corporel, dissoute dans du tampon citrate 0,05 mol/L, pH 4,5 (lot STZ). Le 3<sup>e</sup> lot constitue le lot témoin (lot T), les animaux recevant une injection intra-péritonéale de tampon citrate seul. Deux jours après l'injection, les glycémies des différents lots sont mesurées, et l'on administre à 4 des rats piqués avec la STZ, par voie sous-cutanée, 2 fois par jour, matin et soir, 2 UI d'insuline (Actrapid, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Danemark) par 100 g de poids corporel (lot STZI). Les animaux sont sacrifiés le matin, une semaine après l'injection de STZ, 2 h après la dernière injection d'insuline.

#### **Mesure de la pression artérielle**

La pression artérielle systolique (PA) des animaux est mesurée par méthode non sanglante, au niveau de l'artère caudale [13], à l'aide d'un enregistreur BP Recorder 8005 (W + W Electronic Inc., Basel-Mnschenstein, Suisse), l'animal étant maintenu dans une boîte de contention à 37 °C. La pression artérielle moyenne retenue pour un animal correspond à 5 mesures effectuées à des intervalles de temps réguliers. La PA est mesurée le 1<sup>er</sup> jour de régime pour les animaux de l'expérience 1, la veille de l'injection de STZ ou de tampon citrate pour les animaux de l'expérience 2 et la veille du sacrifice pour tous les animaux.

### ***Préparation des microsomes hépatiques***

Les animaux sont anesthésiés par injection intra-péritonéale de pentobarbital disodique (0,1 mL/100 g) et la glycémie est mesurée à l'aide d'un glucomètre One Touch II (Lifescan, Johnson and Johnson, USA). Les foies sont ensuite excisés, rincés dans une solution de NaCl 0,15 mol/L, séchés sur papier filtre et pesés. Les microsomes hépatiques sont préparés à partir de 3,5 g de foie selon Narce et Poisson [14]. Un dosage des protéines totales de la fraction microsomale est effectué, selon la technique de Layne [15].

### ***Mesure des activités de delta-6 n-3 et delta-6 n-6 désaturation***

Les incubations enzymatiques permettant la détermination de ces activités désaturantes sont effectuées selon Mimouni et Poisson [5]. L'extraction des lipides totaux (LT) des incubations microsomales est réalisée selon la technique modifiée de Folch *et al.* [16]. Les LT sont ensuite saponifiés et les acides gras méthylés selon la technique de Slover et Lanza [17]. La conversion des acides gras précurseurs en leurs produits de désaturation a été évaluée après séparation des diverses fractions d'esters méthyliques d'acides gras par HPLC selon Narce *et al.* [18] grâce à un appareil constitué d'un ensemble de modules Varian (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) puis mesure de leur radioactivité grâce à un spectromètre à scintillation liquide modèle TRICARB 1900TR (Packard, Meriden, CT, USA). Les pourcentages de désaturation conduisent à exprimer les résultats sous la forme d'activités spécifiques (AS : pmol/min/mg de protéines microsomales).

### ***Composition en acides gras des LT hépatiques***

La composition en acides gras des LT hépatiques a été évaluée selon Narce *et al.* [19]. Brièvement, les LT sont extraits selon la méthode modifiée de Folch *et al.* [16] puis saponifiés et les acides gras méthylés selon la méthode de Slover et Lanza [17]. La séparation des acides gras des LT est ensuite effectuée par chromatographie en phase gazeuse à l'aide d'un chromatogramme Packard modèle 419 (Packard, Downers Grove, USA) équipé d'une colonne capillaire de verre de 30 m de long et de diamètre interne de 0,3 mm (Spiral, Couternon, France), avec une phase stationnaire polaire (Carbowax 20). L'injecteur et le détecteur sont maintenus à une température de 230 °C avec l'hélium comme gaz vecteur et l'appareil est couplé à un intégrateur Delsi-Enica 31 (Suresnes, France).

### ***Évaluation de l'expression du gène codant la delta-6 désaturase***

Après extraction selon la technique de Chomczynsky et Sacchi [20], les ARN totaux de foie sont transférés par capillarité sur membrane Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK). Cette membrane est ensuite hybridée avec la sonde marquée de la delta-6 désaturase. Le taux d'ARNm de l'enzyme est alors estimé, par rapport à son standard relatif 18S, à l'aide d'un logiciel informatique (Quantity One, Biorad, Ivry-sur-Seine, France).

### ***Statistiques***

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne arithmétique pour chaque lot témoin et expérimental (moyenne  $\pm$  SEM). La signification des différences est déterminée par le test t de Student-Fischer pour l'expérience 1 et par le test de Newman-Keuls pour l'expérience 2.

## Résultats

### Expérience 1

La glycémie, les poids des rats au sacrifice ainsi que les poids des foies sont présentés dans le *tableau 2*. Les pressions artérielles systoliques, mesurées avant le début du régime et la veille du sacrifice, sont figurées dans le *tableau 3*. Le poids des rats nourris avec le régime fructose est significativement inférieur à celui des rats nourris avec le régime témoin. Bien que les poids des foies ne soient pas différents entre les 2 lots, le rapport poids foie/poids rat du lot Fructose est, en raison du plus faible poids des animaux, significativement supérieur à celui du lot Témoin. Aucune variation de glycémie n'est observée entre les deux lots, que ce soit en cours d'expérimentation ou au moment du sacrifice. Trente semaines de régime expérimental n'entraînent pas de modification significative de la pression artérielle.

**Tableau 2.** *Caractéristiques générales des animaux.*

Glycémie au sacrifice (g/L)	Poids des rats avant le régime (g)	Poids des rats au sacrifice (g)	Poids des foies (g)	(Poids foie/poids rat) x 100	
Lot Témoin	1,71 ± 0,16	322,5 ± 4,5	454,0 ± 9,0	14,0 ± 0,36	3,05 ± 0,07
Lot Fructose	1,72 ± 0,16	316,0 ± 2,5	389,0 ± 4,0**	14,0 ± 0,40	3,66 ± 0,06**

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM des résultats pour 4 rats. La signification des différences entre rats témoins et expérimentaux est déterminée par le test t de Student-Fischer. \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01.

**Tableau 3.** *Pression artérielle systolique.*

190,5 ± 3,0	184,9 ± 3,4	175,5 ± 7,2	181,7 ± 2,3
-------------	-------------	-------------	-------------

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM des résultats pour 4 rats. La signification des différences entre rats témoins et expérimentaux est déterminée par le test t de Student-Fischer. \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01.

Les histogrammes de la *figure 1* représentent les activités microsomales hépatiques de delta-6 n-6 et delta-6 n-3 désaturation, exprimées en pmol/min/mg de protéines incubées. Alors que l'activité de delta-6 n-6 désaturation n'est pas modifiée par le régime, l'activité de delta-6 n-3 désaturation apparaît significativement augmentée après 30 semaines de régime fructose. Les compositions en acides gras majeurs des LT de foie, exprimés en pourcentages molaires, sont présentées dans le *tableau 4*. La teneur en 16 : 0 est significativement diminuée dans le lot Fructose, alors que la teneur en son produit de delta-9 désaturation, le 16 : 1 n-7, est doublée. De même, une augmentation de la teneur en 18 : 1 n-9, également produit de delta-9 désaturation, est observée dans le lot Fructose, sans modification de la teneur en son précurseur, le 18 : 0. La teneur en 18 : 2 n-6 est diminuée sous l'effet du régime fructose. Cette modification ne se répercute pas sur tous ses produits de désaturation ; seul le 22 : 4 n-6 est

significativement diminué après 30 semaines de régime fructose. Les teneurs en 20 : 4 n-6 et 22 : 5 n-6 apparaissent elles aussi diminuées, mais de façon non significative. En ce qui concerne les acides gras en n-3, seule la teneur en 22 : 6 n-3 est quantifiable et est fortement diminuée dans le lot Fructose.

**Tableau 4.** Composition en acides gras majeurs des lipides totaux de foie

% molaire		
lot Témoin	lot Fructose	
16 : 0	29,29 ± 0,37	27,77 ± 0,30*
16 : 1 n-7	0,90 ± 0,09	1,98 ± 0,30*
18 : 0	10,87 ± 0,44	10,57 ± 0,30
18 : 1 n-9 + n-7	18,89 ± 1,18	25,03 ± 0,84**
18 : 2 n-6	13,49 ± 0,34	11,11 ± 0,48**
18 : 3 n-6	0,50 ± 0,01	0,58 ± 0,02*
20 : 4 n-6	19,04 ± 1,05	17,62 ± 0,74
22 : 4 n-6	0,92 ± 0,01	0,55 ± 0,04**
22 : 5 n-6	1,58 ± 0,07	1,47 ± 0,10
22 : 6 n-3	3,02 ± 0,29	1,97 ± 0,05*

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM des résultats pour 4 rats. La signification des différences entre rats témoins et expérimentaux est déterminée par le test t de Student-Fischer. \*p < 0,05 ; \*\*p < 0,01.

La *figure 2* représente l'expression du gène de la delta-6 désaturase, au niveau hépatique. Après 30 semaines de régime, aucune différence significative de son expression n'apparaît entre les deux lots.

### **Expérience 2**

La glycémie, les poids des rats ainsi que les poids des foies sont présentés dans le *tableau 5*. Les pressions artérielles, mesurées la veille de l'injection de STZ ou de citrate et la veille du sacrifice, sont présentées dans le *tableau 6*. La glycémie est fortement augmentée chez les animaux du lot STZ. Lorsque ces animaux reçoivent une injection d'insuline (lot STZI), la glycémie est restaurée à une valeur proche de la normale, voire inférieure à celle des témoins, 2 heures après l'injection. Le poids des animaux recevant une injection de STZ est fortement diminué, bien que leur prise alimentaire ne soit pas modifiée suite à cette injection. Alors que le poids des foies des animaux du lot STZ est fortement diminué, le poids des foies des animaux

du lot STZI est comparable à celui du lot T. En conséquence, les rapports poids du foie/poids du rat sont significativement plus faibles dans le lot STZ par rapport au lot T, alors qu'ils sont plus élevés dans le lot STZI. La pression artérielle est significativement diminuée chez le lot STZI au sacrifice, alors qu'aucune différence significative n'apparaît entre les lots T et STZ.

**Tableau 5.** *Caractéristiques générales des animaux*

Glycémie au sacrifice (g/L)	Poids des rats au sacrifice (g)	Poids des foies (g)	(Poids foie/Poids rat) x 100	
lot T	1,29 ± 0,12 <sup>a</sup>	349,0 ± 9,5 <sup>a</sup>	13,49 ± 0,15 <sup>a</sup>	3,87 ± 0,11 <sup>a</sup>
lot STZ	4,22 ± 0,52 <sup>b</sup>	250,0 ± 9,0 <sup>b</sup>	8,14 ± 0,27 <sup>b</sup>	3,25 ± 0,06 <sup>b</sup>
lot STZI	0,89 ± 0,04 <sup>c</sup>	261,0 ± 3,0 <sup>b</sup>	12,42 ± 0,49 <sup>a</sup>	4,76 ± 0,23 <sup>c</sup>

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM des résultats pour 4 rats. La signification des différences entre les lots est déterminée par le test de Newman-Keuls, les résultats affectés d'une lettre différente étant significativement différents à  $p < 0,05$ .

**Tableau 6.** *Pression artérielle systolique*

Avant injections			Au sacrifice			
lot T	lot STZ	lot STZI	lot T	lot STZ	lot STZI	
PA (mmHg)	193,4 ± 8,7 <sup>a</sup>	192,2 ± 6,45 <sup>a</sup>	194,3 ± 6,7 <sup>a</sup>	203,3 ± 6,7 <sup>a</sup>	198,7 ± 3,3 <sup>a</sup>	183,5 ± 3,0 <sup>b</sup>

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM des résultats pour 4 rats. La signification des différences entre les lots est déterminée par le test de Newman-Keuls, les résultats affectés d'une lettre différente étant significativement différents à  $p < 0,05$ .

Les activités microsomales hépatiques de delta-6 n-6 et delta-6 n-3 désaturation sont présentées dans la *figure 3*. L'injection de STZ n'affecte pas significativement les activités de delta-6 désaturation. L'injection d'insuline, consécutive à l'injection de STZ, diminue significativement l'activité de delta-6 n-3 désaturation. Les compositions en acides gras majeurs des LT de foie des animaux de l'expérience 2, exprimées en pourcentages molaires, sont présentées dans le *tableau 7*. Les teneurs en 16 : 0 et 16 : 1 n-7 sont significativement diminuées dans les lots STZ et STZI, par rapport au lot T. La teneur en 18 : 0 est significativement augmentée dans les deux lots expérimentaux, et de façon encore plus marquée dans le lot STZI ; la teneur en son produit de delta-9 désaturation, le 18 : 1 n-9, est diminuée dans les lots expérimentaux, de manière plus marquée dans le lot STZI. Alors que la teneur en 18 : 2 n-6 est augmentée dans le lot STZ par rapport au lot T, elle est diminuée dans le lot STZI par rapport au lot STZ, et est comparable à celle du lot T. Quant à la teneur en 20 : 4 n-6, elle est significativement augmentée dans le lot STZI, par rapport aux deux autres lots. La teneur en 22 : 4 n-6 est diminuée dans les lots expérimentaux, alors que celle en 22 : 5 n-6 est augmentée par rapport au lot T. En ce qui concerne les acides gras en n-3, la teneur en 22 : 6 n-



3 est supérieure dans le lot STZ par rapport au lot T, et est la plus élevée dans le lot STZI, alors que la teneur en 18 : 3 n-3 diminue dans les lots STZ et STZI, de manière plus prononcée pour ce dernier.

**Tableau 7.** Composition en acides gras majeurs des lipides totaux de foie

% molaire			
lot T	lot STZ	lot STZI	
16 : 0	28,18 ± 0,45 <sup>a</sup>	23,08 ± 0,26 <sup>b</sup>	24,63 ± 0,26 <sup>c</sup>
16 : 1 n-7	3,98 ± 0,79 <sup>a</sup>	1,45 ± 0,14 <sup>b</sup>	1,00 ± 0,07 <sup>b</sup>
18 : 0	6,76 ± 0,18 <sup>a</sup>	11,61 ± 0,38 <sup>b</sup>	14,72 ± 0,17 <sup>c</sup>
18 : 1 n-7 et n-9	16,74 ± 0,54 <sup>a</sup>	13,61 ± 0,65 <sup>b</sup>	9,25 ± 0,21 <sup>c</sup>
18 : 2 n-6	20,91 ± 0,88 <sup>a</sup>	25,07 ± 0,61 <sup>b</sup>	18,96 ± 0,39 <sup>a</sup>
18 : 3 n-6	0,29 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>a</sup>
18 : 3 n-3	0,87 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,67 ± 0,032 <sup>b</sup>	0,35 ± 0,32 <sup>c</sup>
20 : 4 n-6	10,65 ± 0,60 <sup>a</sup>	9,93 ± 0,34 <sup>a</sup>	14,69 ± 0,25 <sup>b</sup>
22 : 4 n-6	0,69 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,45 ± 0,03 <sup>b</sup>	0,43 ± 0,02 <sup>b</sup>
22 : 5 n-6	0,08 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,04 <sup>a</sup>
22 : 6 n-3	6,04 ± 0,57 <sup>a</sup>	10,63 ± 0,52 <sup>b</sup>	12,25 ± 0,40 <sup>c</sup>

Les valeurs représentent la moyenne ± SEM des résultats pour 4 rats. La signification des différences entre les lots est déterminée par le test de Newman-Keuls, les résultats affectés d'une lettre différente étant significativement différents à  $p < 0,05$ .

La *figure 4* représente l'expression du gène de la delta-6 désaturase, au niveau hépatique. L'injection de STZ diminue significativement l'expression du gène de la delta-6 désaturase. L'administration d'insuline, consécutive à l'injection de STZ, restaure partiellement cette expression.

## Discussion

Dans l'expérience 1, le gain de poids des animaux du lot Fructose est inférieur à celui des animaux du lot T, du fait d'une prise alimentaire plus faible. Des observations comparables ont été rapportées par ailleurs [21]. Toutefois, les poids des foies restent comparables entre les deux lots, conduisant à une augmentation du rapport poids foie/poids corporel dans le lot Fructose. En ce qui concerne la glycémie, aucune différence significative n'apparaît entre les lots Témoin et Fructose, ce qui est en accord avec la littérature [12, 21].

Dans la présente étude, la composition en acides gras des LT hépatiques des animaux témoins est légèrement différente de celle décrite préalablement chez le rat SHR adulte par Foucher *et al.* [9], avec un pourcentage molaire plus élevé en acides gras saturés (16 : 0 et 18 : 0), une teneur plus faible en 18 : 2 n-6 et plus élevée en ses produits de désaturation. Cette différence peut être mise en relation avec la composition en lipides du régime, dont la majeure partie est apportée par l'huile de palme, riche en acides gras saturés et monoinsaturés, et aussi avec l'âge des animaux, plus élevé dans la présente étude. En ce qui concerne la composition en acides gras des LT hépatiques des animaux du lot Fructose, on constate une augmentation significative des produits de delta-9 désaturation : la teneur en 16 : 1 n-7 est doublée et la teneur en 18 : 1 n-7 + n-9 est augmentée de plus de 30 %. Ces résultats suggèrent une stimulation de l'activité de delta-9 désaturation. Les teneurs en 18 : 2 n-6 et en ses produits de désaturation à longue chaîne sont diminuées dans le lot Fructose, sans que l'on constate pour autant une modification de l'activité delta-6 n-6 désaturante. Cette observation n'est pas nécessairement surprenante quand on sait qu'il n'existe pas de relations simples entre modification d'activité désaturante et changement de composition en acides gras. En effet, la composition en acides gras dépend non seulement des étapes de désaturation/élongation mais aussi d'autres aspects du métabolisme lipidique, incluant l'oxydation, la disponibilité en substrat, l'acylation, la synthèse d'écossanoïdes, ainsi que l'état nutritionnel et hormonal [22]. En revanche, l'activité de delta-6 n-3 désaturation, partiellement inhibée chez le rat SHR [14], est significativement augmentée dans le lot Fructose. Cette différence pourrait indiquer une sensibilité plus importante de l'activité de delta-6 n-3 désaturation au fructose, considéré comme facteur de régulation alimentaire [2]. L'étude de l'expression du gène de la delta-6 désaturase, sous l'effet du régime enrichi en fructose, ne montre aucune différence significative après 30 semaines de régime, entre les taux de transcrits des différents lots. La stimulation de l'activité delta-6 n-3 désaturante n'est donc pas liée à une augmentation de l'expression du gène de la delta-6 désaturase, mais plutôt à une régulation post-transcriptionnelle.

L'administration d'un régime enrichi en fructose au rat SHR entraîne donc des perturbations du métabolisme des AGPI, différentes de celles observées lors de l'HTA seule [14], avec une activation de l'étape de delta-6 n-3 désaturation et une diminution des teneurs en AGPI en n-6. Par ailleurs, les modifications des teneurs en acides gras monoinsaturés suggèrent une stimulation de l'activité de delta-9 désaturation. Il est aussi à noter que le régime fructose n'a pas aggravé l'HTA du rat SHR adulte, bien que ce régime puisse induire une hypertension chez des rats normotendus [12]. Dans l'expérience 2, comme la prise alimentaire a été la même dans les 3 lots, la perte de poids des animaux ne peut être due qu'à l'action de la STZ, qui favorise la mobilisation des réserves lipidiques à des fins énergétiques. L'injection d'insuline permet bien de maintenir la glycémie des animaux à une valeur proche de la normale, mais la courte durée du traitement, dans notre expérience, ne compense pas la perte de poids des animaux. Cependant, le poids des foies des animaux du lot STZI reste comparable à celui des témoins.

En ce qui concerne la composition en acides gras des LT hépatiques, l'association du diabète de type 1 à l'HTA entraîne des modifications différentes de celles observées lors de l'HTA seule. Les teneurs en produits de delta-9 désaturation (l'acide palmitoléique, 16 : 1 n-7 et l'acide oléique, 18 : 1 n-9) sont significativement diminuées dans les lots expérimentaux, suggérant une diminution de l'activité delta-9 désaturante dans les lots traités à la STZ. Une telle

diminution d'activité a déjà été rapportée chez le rat présentant un diabète de type 1 [5] et chez le rat adulte SHR [9]. Néanmoins, cette inhibition de la delta-9 désaturase renforcerait celle déjà observée lors de l'HTA. Globalement, les différences observées entre les lots STZ et témoin sont encore plus marquées dans le lot STZI : ainsi, les teneurs en 18 : 0 et 22 : 6 n-3 sont plus que doublées dans ce lot, par rapport au lot témoin, soit environ 30 % de plus que dans le lot STZ. La souche SHR présentant une insulino-résistance, l'injection d'insuline n'a pu compenser les altérations des teneurs en acides gras des LT hépatiques causées par l'injection de STZ.

Du fait que les activités de delta-6 désaturation sont partiellement inhibées lors de l'HTA [14], on observe peu de différence entre les lots témoin et expérimentaux lors de l'induction d'un diabète de type 1 par la STZ. Cependant, lors de l'injection d'insuline, l'inhibition de l'activité de delta-6 n-3 désaturation est renforcée, ce qui n'est pas en accord avec les données de la littérature, qui montrent, chez le rat diabétique de type 1, une activation de la delta-6 désaturase sous l'effet de l'insuline [5, 7]. Ce résultat est certainement à mettre en relation avec l'insulino-résistance caractéristique du rat SHR. Le taux de transcrite du gène de la delta-6 désaturase est diminué dans le lot STZ, sans que l'activité soit significativement modifiée. Cette altération de l'expression du gène de la delta-6 désaturase est en accord avec les résultats obtenus par Rimoldi *et al.* [7]. Cependant, le fait que cette altération ne se répercute pas sur l'activité de delta-6 n-6 désaturation reste inexpliqué. En revanche, cette diminution du taux de transcrits est bien corrélée avec la diminution d'activité delta-6 n-3 désaturante observée dans le lot STZI.

En conclusion, cette étude met en évidence que l'association HTA/pathologies diabétiques induit des perturbations importantes de la biosynthèse des acides gras insaturés. Cependant, ces altérations sont différentes, voire opposées, selon le type de diabète. Ainsi, lorsque l'HTA est associée à un diabète de type 2, la teneur hépatique en produits de delta-9 désaturation est augmentée, suggérant une stimulation de la delta-9 désaturase. En revanche, lorsque l'HTA est associée à un diabète de type 1, la teneur hépatique en ces produits est significativement diminuée, même après traitement à l'insuline. De même, la teneur en produits de désaturation à longue chaîne est diminuée lors de l'administration du régime riche en fructose, alors qu'elle est augmentée lorsque les animaux ont reçu une injection de STZ. L'expression du gène de la delta-6 désaturase n'est pas modifiée lorsque l'HTA est associée au diabète de type 2, alors que le taux de transcrite pour ce gène est diminué lorsque l'HTA est associée au diabète de type 1. Un traitement à l'insuline ne rétablit que partiellement l'expression de ce gène. Les activités de désaturation, pas toujours corrélées avec les compositions en acides gras, ne le sont également pas toujours avec ces expressions géniques, ce qui laisse supposer qu'il existerait des régulations à la fois sur le plan transcriptionnel et post-transcriptionnel. L'insulino-résistance du rat SHR renforce les altérations généralement observées lors de ces deux types de diabètes ; ainsi, l'insuline, stimulatrice des activités de désaturation, ne restaure pas ces activités chez le rat SHR streptozotocique, contrairement aux résultats obtenus lors du diabète de type 1 chez le rat Wistar BB [5]. Les mécanismes mis en jeu demandent à être élucidés. De plus, compte tenu des modifications observées au niveau des acides gras monoinsaturés et sachant que l'activité de delta-9 désaturation est diminuée chez le rat SHR, une étude de la régulation du gène de la delta-9 désaturase lors de l'association HTA/pathologies diabétiques s'avère nécessaire.

### **Remerciements :**

Les auteurs remercient le Groupe Lipides et Nutrition (GLN), le Ministère de l'Education Nationale et de la Recherche, et la Région de Bourgogne pour leur soutien financier.

### **RÉFÉRENCES**

1. CLARKE SD (2001). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.*, 131 : 1129-1132.
2. BRENNER RR (1989). Factors influencing fatty acid chain elongation and desaturation. In: *The Role of Fats in Human Nutrition*. AJ Vergroessen, M Crawford, eds. New-York, USA: Academic Press, 45-72.
3. BEZARD J, BLOND JP, BERNARD A, CLOUET P (1994). The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *Reprod. Nutr. Dev.*, 34 : 539-568.
4. POISSON JP, NARCE M, HUANG YS, MILLS DE (1996).  $\gamma$ -linolenic acid biosynthesis and chain elongation in fasting and diabetes. In:  *$\gamma$ -Linolenic Acid: Metabolism and Its Roles in Nutrition and Medicine*. YS Huang, DE Mills, eds. Champaign, USA: AOCS Press, 252-272.
5. MIMOUNI V, POISSON JP (1992). Altered desaturase activities and fatty acid composition in liver microsomes of spontaneously diabetic Wistar BB rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1123 : 296-302.
6. POISSON JP (1985). Comparative *in vivo* and *in vitro* study of the influence of experimental diabetes on rat liver acid delta-6 and delta-5 desaturation. *Enzyme*, 34 : 1-14.
7. RIMOLDI OJ, FINARELLI GS, BRENNER RR (2001). Effects of diabetes and insulin on hepatic delta-6 desaturase gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 283 : 323-326.
8. CHANUSSOT B, NARCE M, POISSON JP (1989). Liver microsomal delta-6 and delta-5 linoleic acid desaturation in female BB rats. *Diabetologia*, 32 : 786-791.
9. FOUCHER C, NARCE M, NASR L, DELACHAMBRE MC, POISSON JP (1997). Liver microsomal membrane fluidity and microsomal desaturase activities in adult spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 15 : 863-869.
10. NARCE M, FRENOUX JM, DARDEL V, *et al.* (1997). Fatty acid metabolism, pharmacological nutrients and hypertension. *Biochimie*, 79 : 135-138.
11. BLOOMGARDEN ZT (1999). Cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 22 : 1739-1744.
12. HWANG IS, HO H, HOFFMAN BB, REAVEN GM (1987). Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*, 10 (5) : 512-516.
13. BUNAG RD (1971). Pressor effects of the tail-cuff method in awake normotensive and hypertensive rats. *J. Lab. Clin. Med.*, 78 (4) : 675-682.

- 14.** NARCE M, POISSON JP (1995). Age-related depletion of linoleic acid desaturation in liver microsomes from young spontaneously hypertensive rats. *Prostag. Leukotr. Ess.*, 53 : 59-63.
- 15.** LAYNE E (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: *Methods in Enzymology*, SP Colowik, NO Kaplan, eds. New-York, USA : Academic Press, 447-454.
- 16.** FOLCH J, LEES M, SLOANE-STANLEY GH (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226 : 497-509.
- 17.** SLOVER HT, LANZA EJ (1976). Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 56 : 933-943.
- 18.** NARCE M, GRETI J, BEZARD J (1988). Method for evaluating the bioconversion of radioactive polyunsaturated fatty acids by use of reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 448 : 249-264.
- 19.** NARCE M, ASDRUBAL P, DELACHAMBRE MC, GRETI J, POISSON JP (1995). Influence of spontaneous hypertension on n-3 delta-6-desaturase activity and fatty acid composition of rat hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem.*, 152 : 7-12.
- 20.** CHOMCZYNSKI P, SACCHI N (1987). Single-step method isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biotech.*, 162 : 156-159.
- 21.** LUO J, RIZKALLA SW, LERER-METZGER M, *et al.* (1995). A fructose-rich diet decreases insulin-stimulated glucose incorporation into lipids but not glucose transport in adipocytes of normal and diabetic rats. *J. Nutr.*, 125 (2) : 164-171.
- 22.** POISSON JP, CUNNANE SC (1991). Long-chain fatty acid metabolism in fasting and diabetes: relation between altered desaturase activity and fatty acid composition. *J. Nutr. Biochem.*, 2 : 60-70. N

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

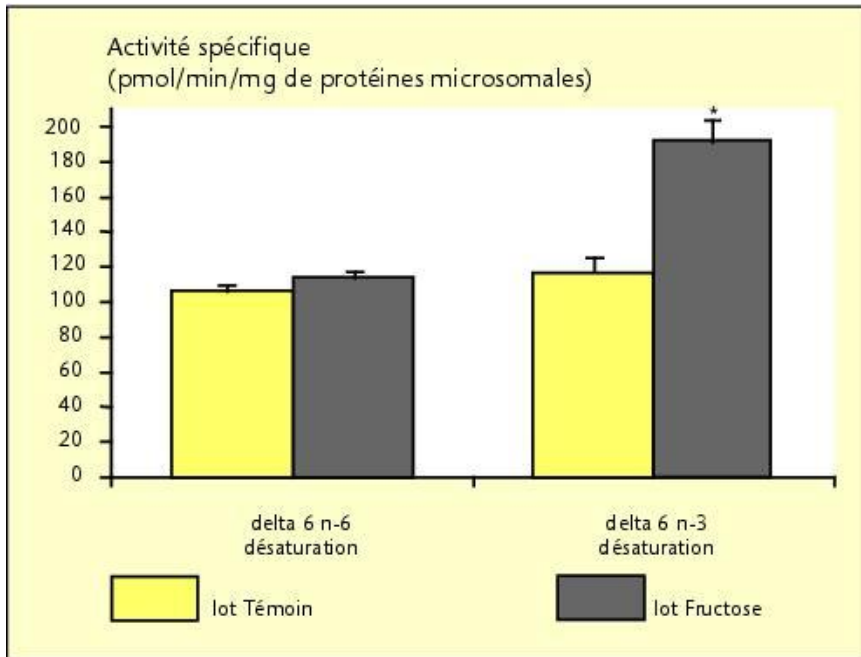
Avant le régime		Au sacrifice	
lot Témoin	lot Fructose	lot Témoin	lot Fructose
PA (mmHg)			

[Redacted]

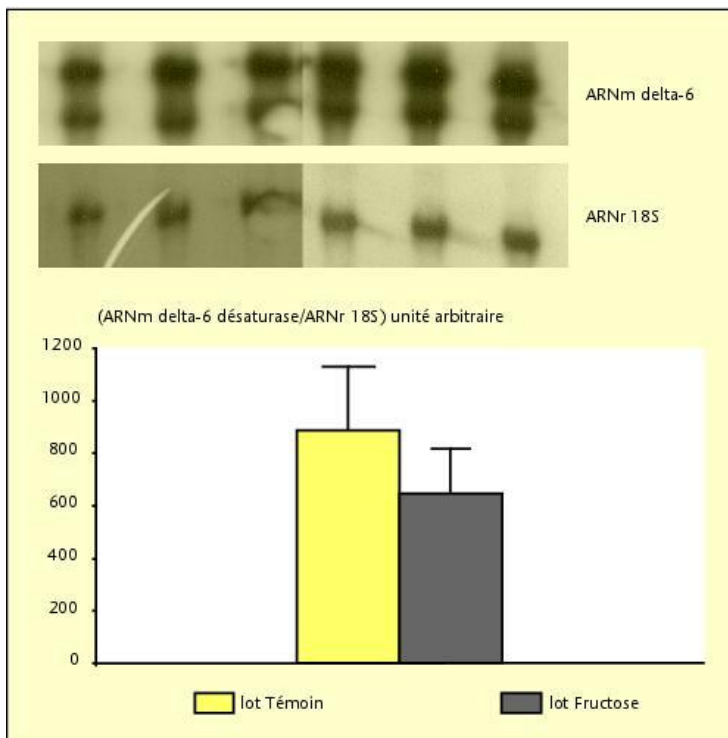
[Redacted]

[Redacted]

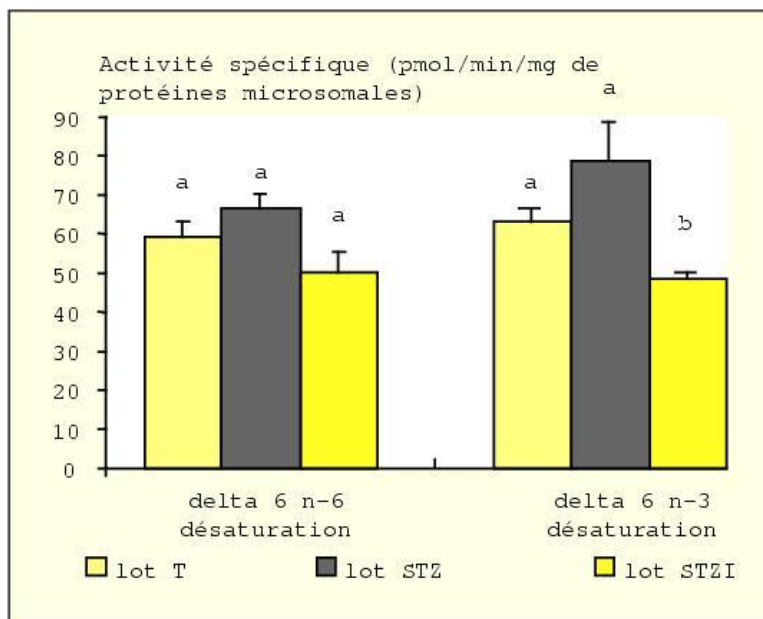
## Illustrations



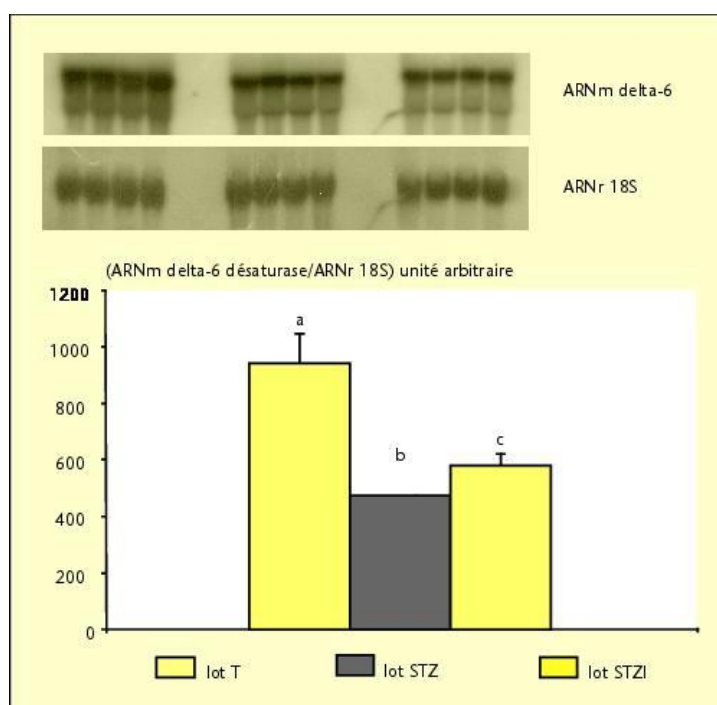
**Figure 1.** Activités de delta-6 n-6 et delta-6 n-3 désaturation. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM des résultats pour 4 rats. La signification des différences entre rats témoins et expérimentaux est déterminée par le test t de Student-Fischer. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ .



**Figure 2.** Expression du gène de la delta-6 désaturase. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM des résultats pour 3 rats. La signification des différences entre rats témoins et expérimentaux est déterminée par le test t de Student-Fischer. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ .



**Figure 3.** Activités de delta-6 n-6 et delta-6 n-3 désaturation. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM des résultats pour 4 rats. La signification des différences entre les lots est déterminée par le test de Newman-Keuls, les résultats affectés d'une lettre différente étant significativement différents à  $p < 0,05$ .



**Figure 4.** Expression du gène de la delta-6 désaturase. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM des résultats pour 4 rats. La signification des différences entre les lots est déterminée par le test de Newman-Keuls, les résultats affectés d'une lettre différente étant significativement différents à  $p < 0,05$ .



