

Effets des lipoprotéines très légères sur la synthèse des acides gras et la sécrétion des VLDL par les hépatocytes isolés

Athina-Despina KALOPISSIS, X. LE LIEPVRE

INSERM U.177, Unité de Recherches sur la Physiopathologie de la Nutrition,
Institut Biomédical des Cordeliers, 15 rue de l'École de Médecine,
75270 Paris Cedex 06.

Summary. *Effects of very-low-density lipoproteins on fatty acid synthesis and VLDL secretion by isolated hepatocytes.*

Hepatic VLDL production appears to be correlated with *de novo* fatty acid synthesis (lipogenesis). In this study lipogenesis was inhibited *in vitro* in order to establish an eventual direct effect on VLDL secretion.

Hepatocytes from rats fed a standard diet were incubated with three triglyceride-rich lipoproteins : chylomicrons and VLDL obtained from rats fed a high-fat diet and VLDL obtained from rats fed a standard diet. The inhibition of lipogenesis (10 to 55 %) was proportional to the concentration of the lipoproteins added. Chylomicrons and VLDL originating mainly from the intestine (prepared from fat-fed rats) inhibited lipogenesis more effectively than VLDL produced essentially by the liver (prepared from rats fed a standard diet). However the secretion of newly synthesized fatty acids in the medium did not decrease. When hepatocyte lipogenesis was inhibited by the addition of 1 mM oleic acid, total VLDL secretion (expressed as nmol of VLDL triglyceride/10⁶ cells) was unchanged compared to control cells incubated without oleic acid.

Our results suggest that hepatic VLDL secretion is not directly related to *de novo* fatty acid synthesis.

Introduction.

Les VLDL (lipoprotéines de très faible densité $d \leq 1,006$ g/ml) sont les principaux transporteurs de triglycérides dans le plasma. Synthétisées dans le foie (pour 80 %) et l'intestin (pour 20 %) selon un processus très complexe d'assemblage de lipides apolaires, essentiellement des triglycérides et quelques esters de cholestérol, avec des protéines spécifiques (appelées apoprotéines), des lipides polaires (phospholipides et cholestérol libre) et des acides sialiques, elles sont sécrétées dans la circulation sans stockage dans l'hépatocyte ou l'entérocyte.

Si les différentes étapes de la formation et du cheminement des VLDL à travers l'hépatocyte sont actuellement bien établies, la régulation métabolique de leur production demeure inconnue. Nous avons abordé la régulation des VLDL hépatiques en focalisant notre attention sur les triglycérides, qui sont leur constituant majeur (60 % de leur masse).

Les triglycérides des VLDL hépatiques ont une origine soit exogène (par estérification des acides gras plasmatiques captés par le foie), soit endogène (provenant des acides gras synthétisés *de novo* par la voie de la lipogenèse). Nous avons relevé dans la littérature un parallélisme étroit entre la synthèse *de novo* des acides gras et la sécrétion des VLDL hépatiques dans de nombreuses situations physiologiques (ingestion de saccharose) ou pathologiques (rats génétiquement obèses Zucker fa/fa). Windmueller et Spaeth (1967) obtiennent même une forte corrélation positive entre la lipogenèse et la sécrétion des VLDL par le foie perfusé.

Dans le présent travail nous avons tenté d'établir si la lipogenèse exerce un rôle régulateur sur la production des VLDL hépatiques. Nous avons utilisé des hépatocytes isolés en survie brève qui offrent la possibilité de tester plusieurs conditions métaboliques sur des cellules provenant du même foie. Notre approche expérimentale consiste à inhiber la lipogenèse *in vitro* et à mesurer l'effet de cette inhibition sur la sécrétion des VLDL. Nous avons utilisé successivement deux inhibiteurs physiologiques de la lipogenèse : des lipoprotéines très légères (chylomicrons et VLDL), comme décrit par Lakshmanan *et al.* (1977) et un acide gras à longue chaîne (acide oléique), comme décrit par Nilsson *et al.* (1973). La lipogenèse est mesurée à partir de l'eau tritiée.

Matériel et méthodes.

Animaux et régimes. — Nous avons utilisé des rats mâles Wistar (Evic Ceba, Blanquefort, France). Les rats donneurs d'hépatocytes sont nourris avec un régime standard de croquettes (UAR) et pèsent 220 à 250 g. Les rats donneurs de lipoprotéines sont répartis en deux lots de 50 animaux par expérience : — le premier lot, nourri avec le régime standard, sert à la préparation de VLDL-témoins (VT) ; — le deuxième lot, nourri pendant deux jours avec un régime hyperlipidique (30 % de lipides en poids), sert à la préparation de chylomicrons et de VLDL (VH). Ces deux lots de rats sont exsanguinés entre 300 et 350 g.

Préparation des lipoprotéines. — Nous avons ultracentrifugé le sérum des rats témoins (sous régime standard) à 100 000 g pendant 16 h pour obtenir les VLDL (Havel *et al.*, 1955). Le sérum des rats soumis au régime hyperlipidique, a été ultracentrifugé d'abord à 10 000 g pendant 30 min pour obtenir les chylomicrons et ensuite à 100 000 g pendant 16 h pour collecter les VLDL. Les fractions lipoprotéiques sont prélevées par aspiration avec une aiguille mousse.

Incubation des hépatocytes. — Nous préparons les hépatocytes selon la méthode de Seglen (1972) (collagénase Boehringer). Après quatre lavages pour éliminer les cellules endothéliales et les cellules de Kupfer, les hépatocytes sont

suspendus dans le milieu de Krebs et Henseleit (1932) contenant 2 % (w/v) de sérum-albumine bovine (dépourvue d'acides gras) et 20 mM de tricine, pH = 7,45. Tous les réactifs proviennent de Sigma. Les hépatocytes sont incubés à 37 °C, à raison de 20×10^6 /fiole, en présence de glucose (20 mM) et d'eau tritiée (0,5 mCi) (CEA, France) dans un volume final de 4 ml. Les incubations sont arrêtées dans la glace ; le contenu des fioles est transvasé dans des tubes en verre et centrifugé à 4 °C à 1 000 g pendant 1 min pour séparer les culots cellulaires du milieu d'incubation. Les culots sont ensuite lavés trois fois avec du NaCl 0,9 % à 4 °C, afin d'éliminer toute trace des surnageants d'incubation.

Protocole expérimental. — Les deux protocoles expérimentaux sont schématisés sur les figures 1 et 2.

Mesure de la lipogénèse. — Les lipides des culots et des surnageants sont extraits séparément avec du chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v) d'après la méthode de Folch *et al.* (1957) et lavés 4-5 fois avec 5 ml du mélange méthanol : eau (1 : 1, v/v) afin d'éliminer toute l'eau tritiée qui n'est pas

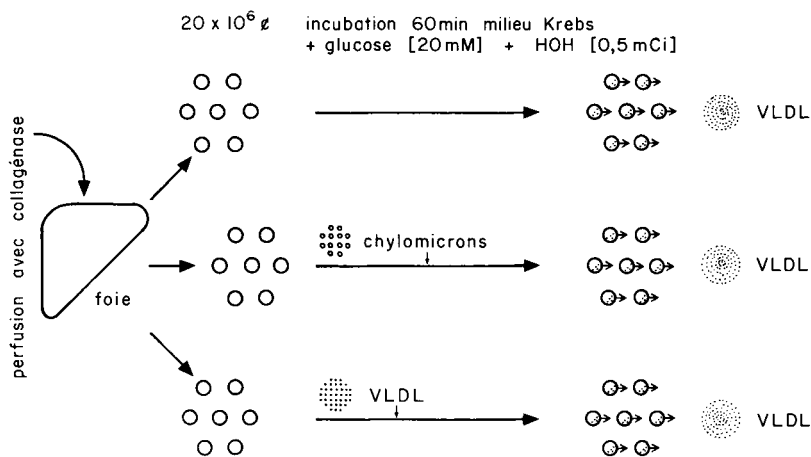


FIG. 1. — Schéma expérimental de la première expérience.

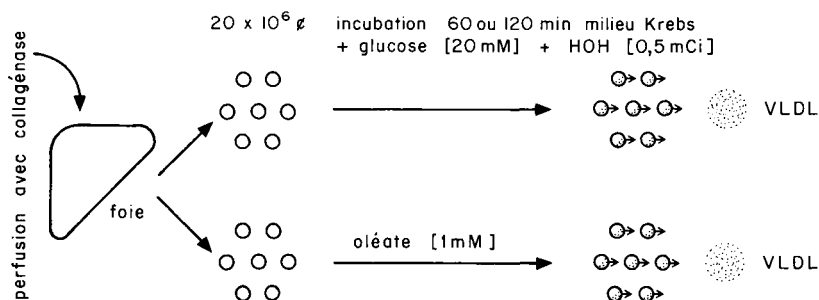


FIG. 2. — Schéma expérimental de la deuxième expérience.

incorporée dans les lipides. La mesure de la lipogenèse est réalisée selon Brunengraber *et al.* (1973). Brièvement : l'extrait lipidique évaporé à sec est repris avec 10 ml de KOH alcoolique (4 %) et saponifié à 80 °C pendant 3 h. Les stérols sont extraits en premier avec 5 ml d'éther de pétrole (3 fois). Ensuite, le milieu est acidifié (pH 1) et les acides gras sont extraits avec 5 ml d'éther de pétrole (3 fois). Stérols et acides gras sont comptés par scintillation liquide (compteur Beckman).

En ce qui concerne la synthèse des acides gras, nous l'exprimons en nmoles de palmitate (qui est le produit final de la lipogenèse), à l'aide du calcul proposé par Windmueller et Spaeth (1966 et 1967).

Mesure de la sécrétion des VLDL par les hépatocytes. — Dans la première expérience (fig. 1), nous avons mesuré la sécrétion des VLDL radioactives sur les surnageants d'incubation, après nous être assurés que plus de 95 % des triglycérides marqués sont sécrétés par les hépatocytes sous forme de VLDL.

Dans la deuxième expérience (fig. 2), nous avons isolé les VLDL par ultracentrifugation des surnageants d'incubation à 100 000 g pendant 20 h, afin de doser leurs triglycérides totaux. Après extraction des lipides des VLDL (Folch *et al.*, 1957) nous avons mesuré leurs triglycérides (dosage enzymatique de glycérol avec les coffrets Boehringer).

Analyse statistique. — Nous avons exprimé les résultats sous forme de moyennes \pm écart-types de la moyenne (SEM) et nous les avons comparés par le test-t de Student.

Résultats.

1^{re} expérience :

Nous avons déterminé la quantité des lipoprotéines très légères à incuber avec les hépatocytes en fonction de leur contenu en triglycérides et non pas en apoprotéines, pour deux raisons : 1) les triglycérides sont le constituant majeur des chylomicrons et des VLDL ; 2) la quantité d'apoprotéines est surestimée, à cause de la contamination par la sérum-albumine pendant la préparation des lipoprotéines par ultracentrifugation (surtout dans le cas des chylomicrons).

Nous avons testé des concentrations de chylomicrons et de VLDL variant entre 0,5 et 3 mg de TG/ml de milieu d'incubation. Ces concentrations ne modifient pas la synthèse des stérols à partir de l'eau tritiée (31 nmoles d'eau tritiée/10⁶C). Ce résultat est en accord avec Lakshmanan *et al.* (1977) et Nomura *et al.* (1981).

La synthèse totale des acides gras, c'est-à-dire la somme des acides gras tritiés des culots hépatocytaires et du milieu d'incubation, est inhibée en présence de chylomicrons et de VLDL (fig. 3). L'inhibition de la lipogenèse globale est proportionnelle à la concentration des lipoprotéines dans le milieu d'incubation. La plus forte inhibition est obtenue avec les chylomicrons (CH) et les VLDL de rats soumis au régime hyperlipidique (VH) et la plus faible avec les VLDL de rats soumis au régime témoin (VT). Nous remarquons qu'il faut deux fois plus de

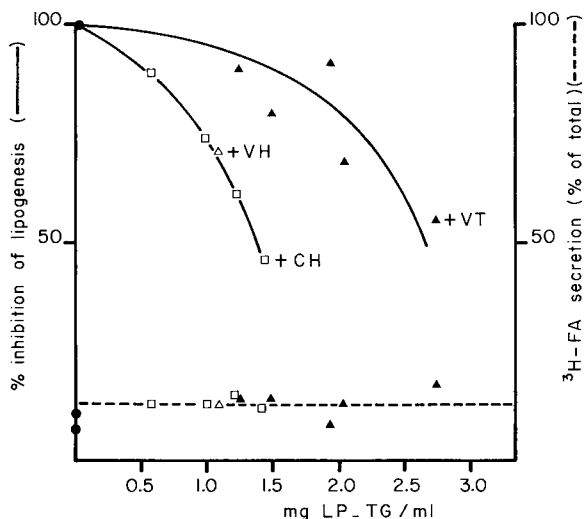


FIG. 3. — Effet des chylomicrons et des VLDL sur la lipogenèse et la sécrétion des VLDL par les hépatocytes isolés. L'inhibition de la lipogenèse est représentée par des traits continus (—) et la sécrétion des acides gras tritiés dans les VLDL par le trait en pointillé (---), pour les hépatocytes incubés seuls (●—●) ou en présence : soit de chylomicrons (CH ; □—□) ; soit de VLDL de rats au régime hyperlipidique (VH ; △—△), soit de VLDL de rats au régime standard (VT ; ▲—▲).

VLDL après régime témoin qu'après régime gras pour inhiber la lipogenèse de 50 %.

Avec les chylomicrons, Lakshmanan *et al.* (1977) ont mesuré une moindre inhibition de la lipogenèse que nous, mais une plus forte inhibition en présence de VLDL (obtenues avec un régime standard). Par contre, Nomura *et al.* (1981) rapportent une forte inhibition de la synthèse des acides gras (AG) par les chylomicrons, qui est comparable à celle que nous mesurons.

Pour pouvoir apprécier l'effet de l'inhibition de la lipogenèse sur la sécrétion des VLDL par les hépatocytes nous avons calculé le rapport :

$$\frac{\text{AG-}^3\text{H du milieu}}{\text{AG-}^3\text{H totaux (milieu + culots)}} \text{---} \text{qui indique la proportion des acides gras néosyn-}$$

thésisés sécrétés sous forme de triglycérides de VLDL. Ce rapport n'est nullement diminué lorsque la lipogenèse est inhibée par les chylomicrons ou les VLDL exogènes (fig. 3). En outre, nous observons que la synthèse des acides gras endogènes contribue faiblement à la production des VLDL hépatiques puisque ce rapport représente seulement 10-15 % de la lipogenèse totale.

2^e expérience :

L'incubation des hépatocytes avec l'oléate (1 mM) résulte en une inhibition de 75 % de la synthèse totale des acides gras après 60 min, en accord avec les résultats de Nilsson *et al.* (1973) (fig. 4). Après 120 min d'incubation, la lipogenèse en présence d'oléate est diminuée de 50 %. La concentration de l'oléate dans le

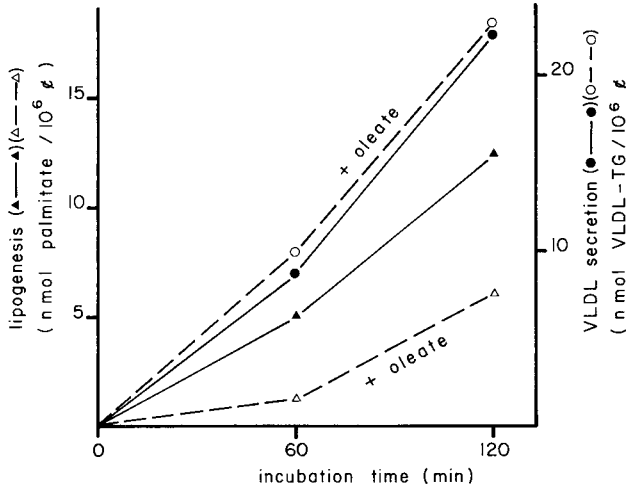


FIG. 4. — Sécrétion des VLDL par les hépatocytes isolés après inhibition de la lipogenèse en présence d'oléate (1 mM).

La lipogenèse est mesurée en absence (▲—▲) ou en présence d'oléate (△---△), la sécrétion totale des triglycérides (TG) des VLDL est obtenue par ultracentrifugation des milieux d'incubation à $1,4 \times 10^8$ g/min, après incubation des hépatocytes en absence (●—●) ou en présence d'oléate (○—○).

milieu à 120 min n'est plus que de 0,25 mM et elle n'est apparemment pas suffisante pour maintenir l'inhibition de la lipogenèse.

En ce qui concerne la sécrétion, nous observons qu'elle est identique en présence ou en absence d'oléate, c'est-à-dire lorsque la lipogenèse est normale ou fortement inhibée ($8,76 \pm 0,04$ (3) nmoles triglycérides/10⁶ cellules vs $9,9 \pm 1,6$ (3) à 60 min et $22,3 \pm 1,7$ (3) vs $23,0 \pm 3,9$ (3) à 120 min respectivement).

Discussion.

La production hépatique des VLDL a été souvent reliée dans la littérature avec la synthèse *de novo* des acides gras, à cause du parallélisme étroit observé entre ces deux voies métaboliques. Toutefois, même si une corrélation statistique positive a été rapportée par Windmueller et Spaeth (1967), une relation de cause à effet entre la lipogenèse et la sécrétion des VLDL n'a jamais été démontrée.

Le but du présent travail était de vérifier expérimentalement si la lipogenèse est un facteur régulateur de la production des VLDL hépatiques. Nous avons donc inhibé l'activité lipogénétique des hépatocytes *in vitro* et à des degrés différents à l'aide de deux inhibiteurs physiologiques (lipoprotéines très légères - oléate). L'inhibition obtenue (observée à partir de 30 min d'incubation ; résultats non publiés, A. D. Kalopissis) n'a aucun effet sur la production des VLDL par les hépatocytes jusqu'à deux heures d'incubation. Ce manque d'effet est observé à la fois sur la sécrétion totale des VLDL (expérience avec l'oléate) et sur la proportion des acides gras endogènes, néosynthétisés, qui apparaissent dans le milieu sous

forme de triglycérides des VLDL (expérience avec les chylomicrons et les VLDL). A la suite de ces résultats il nous paraît peu probable que la lipogenèse exerce un rôle régulateur sur la production des VLDL hépatiques. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure un effet à plus long terme.

Un autre argument qui va à l'encontre d'un rôle régulateur de la lipogenèse sur la synthèse et sécrétion des VLDL est la faible proportion d'incorporation des acides gras néosynthétisés dans les triglycérides des VLDL. Seulement 10 à 13 % des acides gras tritiés forment des triglycérides de VLDL dans les conditions basales (lipogenèse normale) et 12 à 16 % lorsque la lipogenèse est inhibée. Une faible contribution de la lipogenèse à la production des VLDL est aussi retrouvée par d'autres auteurs. Notamment, Windmueller et Spaeth (1967) rapportent sur foie perfusé que 16 % des acides gras issus de la lipogenèse apparaissent dans les VLDL sécrétées et ce pourcentage n'est pas modifié lorsque la lipogenèse augmente sous l'effet d'un jeûne de 48 h suivi d'une réalimentation de 48 à 60 h.

Un résultat surprenant a été la plus forte inhibition de la lipogenèse avec les chylomicrons et les VLDL de rats soumis au régime hyperlipidique par rapport aux VLDL de rats nourris avec le régime témoin. Une explication possible pourrait être leur origine différente. En effet, les VLDL dans les conditions standard sont d'origine essentiellement hépatique (pour 80 % environ). Par contre, il est connu que les chylomicrons sont formés exclusivement dans l'intestin. Dans un travail antérieur (Kalopissis *et al.*, 1982), nous avons montré que les VLDL de rats soumis à une alimentation riche en lipides sont sécrétées en majorité (pour 64 %) par l'intestin. Or, il est bien établi (Wu et Windmueller, 1979) que l'intestin ne synthétise pas exactement les mêmes apoprotéines que le foie, ni dans les mêmes proportions. Il se pourrait donc qu'une ou plusieurs apoprotéines intestinales soit mieux « reconnue » par le foie et induise ainsi une réponse métabolique plus grande.

Conclusion.

L'activité lipogénétique des hépatocytes isolés est inhibée rapidement *in vitro* en présence de lipoprotéines très légères (chylomicrons et VLDL) ou d'un acide gras à longue chaîne (oléate). Le degré d'inhibition de la lipogenèse diffère selon la nature des lipoprotéines ajoutées dans le milieu d'incubation : les chylomicrons et VLDL de rats soumis au régime hyperlipidique (origine essentiellement intestinale) inhibent plus la lipogenèse que les VLDL de rats nourris avec un régime standard (origine surtout hépatique).

Toutefois, la sécrétion des VLDL par les hépatocytes n'est pas modifiée après l'inhibition de la lipogenèse. Nos résultats suggèrent que la lipogenèse ne joue pas un rôle régulateur sur la production des VLDL, tout au moins à court terme.

*10^e Réunion du groupe Développement I.N.R.A.,
Rennes, 9-10 mai 1984.*

Remerciements. — Nous voudrions remercier tout particulièrement la D.G.R.S.T. pour le financement de ce travail (Contrat n° 80.7.0133).

Références

- BRUNENGRABER H., BOUTRY M., LOWENSTEIN J. M., 1973. Fatty acid and 3- β -hydroxysterol synthesis in the perfused rat liver. *J. biol. Chem.*, **248**, 2656-2669.
- FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- HAVEL R., EDER H. A., BRAGDON J. H., 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. clin. Invest.*, **34**, 1345-1353.
- KALOPISSIS A. D., GRIGLIO S., LE LIEPVRE X., 1982. Intestinal very low density lipoprotein secretion in rats fed various amounts of fat. *Biochim. biophys. Acta*, **711**, 33-39.
- KREBS H. A., HENSELEIT K., 1932. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Z. Physiol. Chem.*, **210**, 33-66.
- LAKSHMANAN M. R., MUESING R. A., COOK G. A., VEECH R. L., 1977. Regulation of lipogenesis in isolated hepatocytes by triglyceride-rich lipoproteins. *J. biol. Chem.*, **252**, 6581-6585.
- NILSSON A., SUNDLER R., ÅKESSON B., 1973. Biosynthesis of fatty acids and cholesterol in isolated rat-liver parenchymal cells. *Eur. J. Biochem.*, **39**, 613-620.
- NOMURA T., IRVING E. A., HARRIS R. A., 1981. Comparison of the metabolic effects of chylomicrons and their remnants on isolated hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **211**, 211-221.
- SEGLÉN P. O., 1972. Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca^{2+} on enzymatic dispersion of isolated perfused liver. *Exp. Cell Res.*, **74**, 450-454.
- WINDMUELLER H. G., SPAETH A. E., 1966. Perfusion *in situ* with tritium oxide to measure hepatic lipogenesis and lipid secretion. Normal and orotic acid-fed rats. *J. biol. Chem.*, **241**, 2891-2899.
- WINDMUELLER H. G., SPAETH A. E., 1967. *De novo* synthesis of fatty acid in perfused rat liver as a determinant of plasma lipoprotein production. *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, 362-369.
- WU A. L., WIDMUELLER H. G., 1979. Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. *J. biol. Chem.*, **254**, 7316-7322.
-