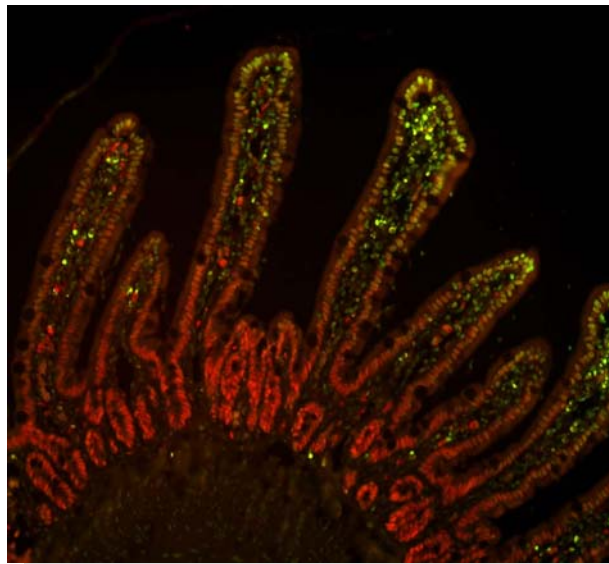


Par

Caroline HABOLD

**Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'absorption intestinale
au cours du jeûne et après réalimentation**



Soutenue le 26 octobre 2004 devant la commission d'examen :

Jean-Louis GENDRAULT

Professeur, Université Louis Pasteur, Strasbourg

Rapporteur Interne

Yvon LE MAHO

Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg

Directeur de Thèse

Gilles MITHIEUX

Directeur de Recherche, CNRS, Lyon

Rapporteur Externe

Daniel RIGAUD

Professeur, Centre Hospitalier Universitaire, Dijon

Rapporteur Externe

Charlotte FOLTZER-JOURDAINNE

Chargée de Recherche, INSERM, Strasbourg

Membre Invité

Jean-Hervé LIGNOT

Maître de Conférences, Université Louis Pasteur, Strasbourg

Membre Invité

Résumé

L'épithélium de l'intestin grêle est atrophié après un jeûne court défini comme phase de mobilisation des réserves lipidiques (phase II), et surtout après un jeûne prolongé caractérisé par un catabolisme protéique élevé (phase III). Au niveau cellulaire cependant, alors que la phase II du jeûne est marquée par une diminution de la prolifération et de la migration cellulaires, la phase III présente une augmentation de ces mécanismes. La phase III se caractérise aussi par un arrêt de l'apoptose intestinale qui permettrait de préserver les entérocytes et donc l'absorption de nutriments dès réalimentation. La reprise de l'activité cellulaire et l'arrêt de l'apoptose en phase III seraient induits par une baisse des cytokines $TNF\alpha$ et $TGF\beta 1$ et du facteur de transcription intestinal Cdx2. L'augmentation de la prolifération cellulaire initiée déjà pendant la phase III du jeûne entraînerait une restauration de l'épithélium intestinal après réalimentation toute aussi rapide qu'après un jeûne plus court.

L'expression des transporteurs actifs PepT1 et SGLT1 ainsi que l'activité néoglucogénique intestinale sont stimulées au cours de la phase III mais pas pendant la phase II du jeûne. L'augmentation de la protéine SGLT1 pendant la phase III du jeûne permet une absorption immédiate de glucose dès réalimentation. La présence en grande quantité de la protéine PepT1 en phase III du jeûne devrait permettre une absorption de peptides et donc un apport azoté dès réalimentation. La réalimentation enfin, stimule l'expression des transporteurs facilités GLUT5, GLUT2 et FATP4.

Lorsque le jeûne se prolonge et que l'animal atteint un seuil critique de déplétion de ses réserves énergétiques, l'activation de mécanismes cellulaires et moléculaires spécifiques entraînerait une optimisation de la capacité d'absorption des nutriments par la muqueuse de l'intestin grêle dès réalimentation.

Mots-Clés

Jeûne, expression génique, quantité de protéines, immunolocalisation, prolifération cellulaire, apoptose, cytokines, transport de nutriments, néoglucogénèse

Title

Intestinal morphology, cellular dynamics and physiology according to body fuel availability in rats

Abstract

After the early adaptation to fasting (phase I), an atrophy of the intestinal mucosa occurs during the period which is characterized by the mobilization of fat stores and an efficient protein sparing. This atrophy is aggravated during the further rise in protein utilization (phase III). Cell proliferation and migration decrease during phase II, but strongly increase during a phase III fast and may therefore initiate mucosal repair well before food becomes available. Also, a phase III fast induces an arrest in intestinal epithelial apoptosis at the tip of the villi, suggesting preservation of absorptive cells. The lack of apoptosis and initiation of cell proliferation during phase III fasting may be triggered by a decrease in the cytokines $TGF\beta 1$, and $TNF\alpha$ and in the intestine specific transcription factor Cdx2. They are concomitant with a peak of locomotor activity in these animals induced by a rise in plasma corticosterone and reflecting the search for food.

Intestinal gluconeogenesis is increased during a phase III fast, when the availability of amino acids used as precursors raises. At the same time, the active glucose and peptide transporters are enhanced. Glucose can then, be immediately absorbed at low concentrations through SGLT1. Glucose and peptides should be used as a source of energy and peptides should also provide body protein precursors. Finally, refeeding following either a phase II or a phase III fast stimulates facilitative fatty acids and glucose transports, so that large amounts of these metabolites can be transported from the intestinal lumen to the blood stream and provides energy.

The unaltered and even increased absorption capabilities of the intestine during a phase III fast when the animal reaches a low threshold in nutrient reserves, coincides with a search for food activity and could permit food assimilation immediately after refeeding.

Keywords

Fasting, gene expression, protein level, immunolocalization, cell proliferation, apoptosis, cytokines, nutrient transport, gluconeogenesis

SOMMAIRE

INDEX DES FIGURES	5
ABREVIATIONS UTILISEES	7
AVANT-PROPOS	9
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	11
1. Le métabolisme énergétique	13
1.1. Balance énergétique équilibrée	13
1.1.1. Réserves et substrats énergétiques	14
1.1.1.1. Le glucose	14
1.1.1.1.1. Consommation du glucose	14
1.1.1.1.2. La synthèse endogène de glucose ou néoglucogenèse	15
1.1.1.2. Les autres substrats énergétiques	18
1.1.1.2.1. Les lipides	18
1.1.1.2.2. Les protéines	19
1.1.2. Régulation de la balance énergétique	21
1.1.3. Hormones et réserves énergétiques	21
1.2. Balance énergétique négative	22
1.2.1. Utilisation des réserves énergétiques au cours du jeûne	23
1.2.1.1. Les trois phases métaboliques du jeûne	23
1.2.1.1.1. La première phase d'adaptation au jeûne (phase I)	24
1.2.1.1.2. La phase II	24
1.2.1.1.3. La phase III	24
1.2.2. Déséquilibre de la balance énergétique	25
1.2.3. Modifications hormonales	26
1.3. Balance énergétique positive	28
1.3.1. Réserves et substrats énergétiques	28
1.3.2. Déséquilibre de la balance énergétique	29
1.3.3. Modifications hormonales et du niveau de l'expression génique des neuropeptides	29
2. L'intestin grêle	29
2.1. Anatomie et histologie	29
2.2. Renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal	33
2.2.1. Prolifération cellulaire	33
2.2.2. Apoptose	33
2.2.3. Régulation des mécanismes cellulaires de l'épithélium intestinal	34
2.2.3.1. Régulation nerveuse	34
2.2.3.2. Régulation par des facteurs de croissance	35
2.2.3.3. Régulation hormonale	35
2.2.3.4. Régulation par les nutriments	35
2.3. Mécanismes de l'absorption intestinale	36
2.3.1. Absorption de l'eau et des électrolytes	36
2.3.1.1. Perméabilité passive aux ions et à l'eau	36
2.3.1.2. Absorption active de l'eau et des électrolytes	37
2.3.1.2.1. Absorption dépendante des nutriments	37
2.3.1.2.2. Absorption indépendante des nutriments	37
2.3.1.3. Sécrétion active des électrolytes	38
2.3.2. Absorption des vitamines et des sels minéraux	38
2.3.3. Absorption des glucides	38
2.3.4. Absorption des protéines	41
2.3.5. Absorption des lipides	43

2.3.6. Régulation des processus impliqués dans l'absorption intestinale	46
2.3.6.1. Régulation hormonale et par les neurotransmetteurs	46
2.3.6.1.1. Absorption (et sécrétion) de l'eau et des électrolytes	46
2.3.6.1.2. Absorption des sels minéraux et des vitamines	46
2.3.6.1.3. Absorption des glucides	46
2.3.6.1.4. Absorption des acides aminés et des peptides	47
2.3.6.1.5. Absorption des acides gras et des stérols	48
2.3.6.2. Régulation par les nutriments	48
2.3.6.2.1. Absorption des sels minéraux et des vitamines	48
2.3.6.2.2. Absorption des glucides	49
2.3.6.2.3. Absorption des acides aminés et des peptides	49
2.3.6.2.4. Absorption des acides gras et des stérols	50
2.4. Néoglucogénèse intestinale	50
3. Effets du jeûne et de la réalimentation sur l'intestin grêle	51
3.1. Le jeûne	51
3.1.1. Effets sur la morphologie intestinale	51
3.1.2. Effets sur la fonction intestinale	52
3.1.2.1. Modifications non spécifiques	52
3.1.2.2. Le transport des ions et de l'eau	52
3.1.2.3. Le transport des vitamines et des sels minéraux	53
3.1.2.4. L'absorption des oligosaccharides	54
3.1.2.5. Le transport des acides aminés	55
3.1.2.6. L'absorption des lipides	55
3.1.2.7. La néoglucogénèse	55
3.2. La réalimentation	56
3.2.1. Restauration morphologique	56
3.2.2. Restauration fonctionnelle	57
PROBLEMATIQUE ET APPROCHE EXPERIMENTALE	59
1. Problématique et objectifs	61
2. Approche expérimentale	62
2.1. Modèle animal et traitements nutritionnels	62
2.2. Analyses réalisées	63
2.2.1. Dosages plasmatiques	63
2.2.2. Prélèvements de tissus	64
2.2.3. Analyses moléculaires	64
2.2.4. Analyses biochimiques	64
2.2.5. Mesures <i>in vivo</i>	64
2.2.6. Analyses morphologiques et histologiques	65
RESULTATS – DISCUSSION	67
Article 1 : Utilisation de l'ESEM en biologie, comparaison avec le CSEM	69
1. Introduction	69
2. Article	71
3. Résultats – Discussion	74
Article 2 : Effets du jeûne et de la réalimentation sur la morphologie et les mécanismes cellulaires jéjunaux en fonction du niveau de déplétion des réserves corporelles chez le rat	76
1. Introduction	76

2. Article	78
3. Résultats – Discussion	81
Article 3 : Apoptose intestinale chez des rats à jeun et réalimentés en relation avec l'état métabolique et hormonal	83
1. Introduction	83
2. Article	85
3. Résultats – Discussion	87
Article 4 : Néoglucogenèse intestinale et absorption du glucose chez le rat en fonction de la disponibilité des réserves énergétiques	117
1. Introduction	117
2. Article	119
3. Résultats – Discussion	147
4. Résultats complémentaires à cet article	148
4.1. Introduction	148
4.2. Méthodes	149
4.3. Résultats et discussion	149
Résultats complémentaires	151
1. Introduction	151
2. Résultats et discussion	152
2.1. Effets du jeûne et de la réalimentation sur la quantité de protéine FATP4	152
2.2. Effets du jeûne sur la quantité de protéine PepT1	154
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	157
1. Conclusion générale	159
2. Perspectives	161
2.1. Effets des phases ou de la durée du jeûne ?	161
2.2. Rôle de la corticostérone ?	161
2.3. Etude de l'apoptose	162
2.4. Mesures de l'absorption des protéines et des lipides	162
2.5. Effets de réalimentations différenciées	162
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	163
ANNEXES	191

INDEX DES FIGURES

Figure 1. La glycolyse	15
Figure 2. La néoglucogenèse	16
Figure 3. La lipolyse	18
Figure 4. Les réactions du cycle de Krebs	20
Figure 5. Evolution de la masse corporelle (a), de la perte de masse journalière dm/mdt (b) et de l'excrétion d'azote (c) au cours du jeûne chez le rat	23
Figure 6. Effets du jeûne sur l'excrétion d'azote chez le rat	26
Figure 7. Structure de l'intestin grêle, amplification de la surface d'échange	30
Figure 8. Structure de la paroi intestinale	31
Figure 9. Structure de la muqueuse intestinale	31
Figure 10. Types cellulaires constitutifs de l'épithélium intestinal	32
Figure 11. Hydrolyse des disaccharides en monosaccharides	39
Figure 12. Modèle de régulation de l'absorption facilitée du glucose après un repas	40
Figure 13. Modèle de transport du glucose dans l'entérocyte	41
Figure 14. Modèle cellulaire de l'absorption des acides aminés par les HATs	42
Figure 15. Modèle cellulaire de l'absorption des triglycérides	44
Figure 16. Modèle cellulaire de l'absorption des acides gras	45
Figure 17. Protocole expérimental	63
Figure 18. Immunomarquage d'AQP1 au niveau de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques	82
Figure 19. Activité de la sucrase-isomaltase dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0, P2r2, P2r6, P2r24, P3r0, P3r2, P3r6, P3r24	149
Figure 20. Activité de la lactase dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0, P2r2, P2r6, P2r24, P3r0, P3r2, P3r6, P3r24	150
Figure 21. Quantité de protéine FATP4 dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0, P2r2, P2r6, P2r24, P3r0, P3r2, P3r6, P3r24	152

Figure 22. Immunolocalisation de la protéine FATP4 dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0 et P2r24 **153**

Figure 23. Quantité de protéine PepT1 dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0 et P3r0 **154**

Figure 24. Immunolocalisation de la protéine PepT1 dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0 et P3r0 **155**

Page de couverture : Co-immunomarquage de cellules en apoptose (noyaux colorés en vert) et de cellules exprimant Cdx2 (noyaux colorés en rouge) dans les villosités intestinales chez un rat nourri

ABREVIATIONS UTILISEES

ABC : ATP binding cassette, site de liaison de l'ATP
ACAT : acyl-CoA cholestérol acyltransferase
ACBP : acyl-CoA binding protein, protéine liant les acides gras et l'acyl-CoA
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
AQP : aquaporine
ARNm : acide ribonucléique messenger
ATP : adénosine triphosphate
Bcl-2 : B-cell CLL/lymphoma 2, protéine anti- ou pro-apoptotique
CD36 : cluster determinant 36, transporteur d'acides gras et de stérols
Cdx : caudal-related homeodomain protein, facteur de transcription intestinal
CoA : coenzyme A
CRE : élément de réponse à l'AMPc
DAG : diacylglycérols
DCT1 : divalent-cation transporter 1, transporteur de cations divalents
EGF : epidermal growth factor, facteur de croissance épidermique
FABP : fatty acid binding protein, protéine (membranaire ou cytosolique) liant les acides gras et l'acyl-CoA
FAT : fatty acid translocase, transporteur d'acides gras et de stérols
FATP : fatty acid transport protein, transporteur d'acides gras
GDP : guanosine diphosphate
GH : growth hormone, hormone de croissance
GIP : gastric inhibitory peptide, peptide inhibiteur gastrique
Glc6Pase : glucose 6-phosphatase
GLP : glucagon-like peptide, peptide analogue au glucagon
GLUT : glucose transporter, transporteur d'hexoses
GTP : guanosine triphosphate
HAT : heteromeric amino acid transporter, transporteur d'acides aminés hétéromère
HDL : high density lipoprotein, lipoprotéine de haute densité
HNF : hepatocyte nuclear factor, facteur de transcription
IGF : insulin-like growth factor, facteur de croissance analogue à l'insuline
IL : interleukine
IRE : élément de réponse à l'insuline
ITF : intestinal trefoil factor, facteur intestinal dit « en feuille de trèfle »
LACS : long chain acyl-CoA synthetase, catalyse la réaction d'estérification des acides gras et du CoA
LCFA : long chain fatty acid, acide gras à longue chaîne
LDL : low density lipoprotein, lipoprotéine de faible densité
MAG : monoacylglycérols
NAD⁺, NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaK2Cl : cotransporteur de sodium, potassium et chlore
NHE : échangeur sodium-proton
PEP : phosphoénolpyruvate
PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase
PepT1 : cotransporteur peptides-protons 1
PKA : protéine kinase A
RT-PCR : transcription réverse – réaction de polymérisation en chaîne
RU486 : mifépristone
SGLT1 : sodium-glucose cotransporteur 1, transporteur actif du glucose
SR-BI : scavenger receptor BI, transporteur de stérols
TAG : triacylglycérols
TGF : transforming growth factor, facteur de croissance transformant
TNF : tumor necrosis factor, facteur nécrosant des tumeurs
VIP : vasoactive intestinal peptide, peptide intestinal vasoactif
VLDL : very low density lipoprotein, lipoprotéine de très faible densité

AVANT-PROPOS

Afin d'assurer une balance énergétique équilibrée (**cf. Revue Bibliographique 1.1.**), l'apport énergétique par l'alimentation doit nécessairement couvrir les dépenses d'énergie pour la maintenance et / ou la croissance de l'organisme, le travail musculaire, les productions éventuelles (lait par exemple) et la thermogenèse. La rupture de cet équilibre se traduit soit par une augmentation de la masse corporelle liée à l'accumulation de réserves dans le cas d'une balance énergétique positive (**cf. Revue Bibliographique 1.3.**), soit par un amaigrissement dans le cas d'une balance énergétique négative (**cf. Revue Bibliographique 1.2.**).

Un amaigrissement lié à une diminution ou à un arrêt de la prise alimentaire survient dans les conditions naturelles lorsque la disponibilité du milieu en ressources alimentaires diminue ou lorsque l'activité de recherche alimentaire est incompatible avec le succès de la reproduction, de la mue, de l'hibernation ou de la migration. Trois phases ont été décrites en fonction de changements de la vitesse d'amaigrissement, de l'utilisation des réserves corporelles et de modifications hormonales et comportementales survenant lors d'un jeûne total spontané chez l'animal dans son milieu ou expérimental chez le rat de laboratoire.

L'intestin grêle est un organe important, tant par sa taille et sa surface d'échange (**cf. Revue Bibliographique 2.1.**) que par ses fonctions d'hydrolyse et d'absorption des aliments (**cf. Revue Bibliographique 2.3.**), ainsi que par sa contribution à la synthèse endogène de glucose (**cf. Revue Bibliographique 2.4.**). Les cellules constitutives de son épithélium absorbant sont en constant renouvellement (**cf. Revue Bibliographique 2.2.**).

Un jeûne court (inférieur à 3 jours) suffit pour induire une atrophie de l'épithélium de l'intestin grêle. Celle-ci est liée à une diminution de la prolifération des cellules et à une augmentation de l'apoptose (**cf. Revue Bibliographique 3.1.**). La perméabilité de l'épithélium à l'eau et aux nutriments est accrue et la néoglucogenèse intestinale stimulée. Ces processus sont rapidement normalisés dès la restauration de l'alimentation (**cf. Revue Bibliographique 3.2.**). Les effets d'un jeûne prolongé sur la structure et la fonction intestinales sont cependant encore mal connus. Aucune étude tenant compte de l'état métabolique et hormonal des animaux à jeun et donc de la disponibilité en substrats énergétiques, notamment en précurseurs de la néoglucogenèse, n'a été réalisée.

Le but de nos travaux a donc été de caractériser les changements induits par l'état métabolique et hormonal des animaux à jeun puis réalimentés sur la morphologie et sur le renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal, ainsi que sur certains transporteurs de

nutriments et les enzymes néoglucogéniques. Les méthodes employées et les résultats obtenus sont présentés en fonction des articles auxquels ils ont donné lieu, ainsi que dans une partie complémentaire. Ce mémoire s'achève par une conclusion générale faisant la synthèse de tous les résultats acquis et ouvre des perspectives d'études visant à prolonger et compléter ces travaux.

Revue bibliographique

1. Le métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique d'un animal est la somme des bilans énergétiques des cellules qui le constituent. L'énergie chimique contenue dans les nutriments est transformée au cours d'oxydations cellulaires aboutissant à la formation d'adénosine triphosphate (ATP). C'est la forme d'énergie directement utilisable par les cellules qui va permettre, entre autres, la contraction musculaire et le maintien des gradients trans-membranaires. Le rendement global de ces réactions est de l'ordre de 20%, d'où une dissipation de 80% de l'énergie chimique des aliments sous forme de chaleur (Kleiber, 1961).

Au niveau de l'organisme entier, un animal absorbe l'énergie sous une forme chimique (aliments) qu'il restitue au milieu ambiant sous forme de travail et de chaleur (moins l'énergie contenue dans les fèces et les urines, la rétention d'énergie lors de la croissance, et l'énergie contenue dans une éventuelle production, comme le lait par exemple). Bien que la masse et la composition corporelle d'un animal puissent considérablement varier dans des situations telles que la reproduction, la préparation à la migration ou à l'hibernation, elles restent globalement stables à long terme, ce qui implique une régulation de la balance énergétique. L'équilibre de la balance énergétique est assuré lorsque l'entrée d'énergie (*i.e.* la prise alimentaire) est égale à la dépense énergétique. Toute rupture de cet équilibre, qu'elle soit le fait d'un dérèglement de la prise alimentaire et / ou d'un dérèglement du niveau de la dépense énergétique, conduit à une augmentation de la masse corporelle dans le cas d'une balance énergétique positive et à un amaigrissement dans le cas contraire.

1.1. Balance énergétique équilibrée

A long terme, la masse et la composition corporelle, et conséquemment la balance énergétique sont stables en dépit de fluctuations journalières de la prise alimentaire et du niveau de la dépense énergétique qui peuvent être très importantes. De même, la prise alimentaire est plus ou moins épisodique, alors que la dépense énergétique, bien que d'intensité variable, est continue. Ces deux constatations mettent en évidence la nécessité de stocker au moins temporairement des nutriments lors des épisodes de prise alimentaire, afin

d'assurer la continuité de la fourniture en nutriments aux cellules durant les phases inter-prandiales.

1.1.1. Réserves et substrats énergétiques

Les réserves énergétiques de l'organisme sont constituées en partie de glucides (glucose sous forme de glycogène), situés dans le foie et dans les muscles, et de lipides (acides gras estérifiés en triglycérides) situés majoritairement dans le tissu adipeux blanc. Les acides aminés provenant de l'alimentation et du catabolisme des protéines corporelles représentent également une source d'énergie pour l'organisme.

1.1.1.1. Le glucose

1.1.1.1.1. Consommation du glucose

Bien qu'étant le seul nutriment non indispensable, le glucose (qui est le représentant majeur des glucides) est le substrat énergétique privilégié des cellules. Certaines cellules, dépourvues de mitochondries comme les hématies, sont même strictement dépendantes du glucose pour leur apport énergétique, car leur synthèse d'ATP ne se fait que par la voie de la fermentation. Par ailleurs, au moins la moitié de la fourniture énergétique du système nerveux central provient du glucose, même en période de jeûne prolongé, et le transport intracellulaire de glucose est maintenu dans les cellules nerveuses pour assurer la formation d'ATP par le métabolisme aérobie.

Le glycogène représente la forme de stockage du glucose dans les tissus, réserve utilisée en tant que source énergétique au cours des périodes post-absorptives et de jeûne court. Le glycogène musculaire permet de produire localement les substrats énergétiques nécessaires au travail musculaire, alors que le glycogène hépatique est utilisé pour la régulation de la glycémie (Steffens *et al.*, 1990).

Au niveau cellulaire, le glucose est transformé en énergie par la voie de la glycolyse (**figure 1**). La glycolyse est constituée d'une succession de réactions biochimiques au cours desquelles le glucose est transformé en acide pyruvique, avec production d'énergie (sous forme d'ATP) et d'éléments réduits. Ces réactions se déroulent dans le cytoplasme de la presque totalité des cellules de l'organisme. En condition aérobie, une mole de glucose est scindée en deux moles de pyruvate avec formation de deux moles d'ATP et de $\text{NADH} + \text{H}^+$. La dégradation complète du pyruvate se poursuit par son entrée dans le cycle de Krebs. Au

total, la dégradation complète d'une mole de glucose produit trente huit moles d'ATP. En condition anaérobie, le pyruvate est réduit en lactate avec formation de NAD^+ .

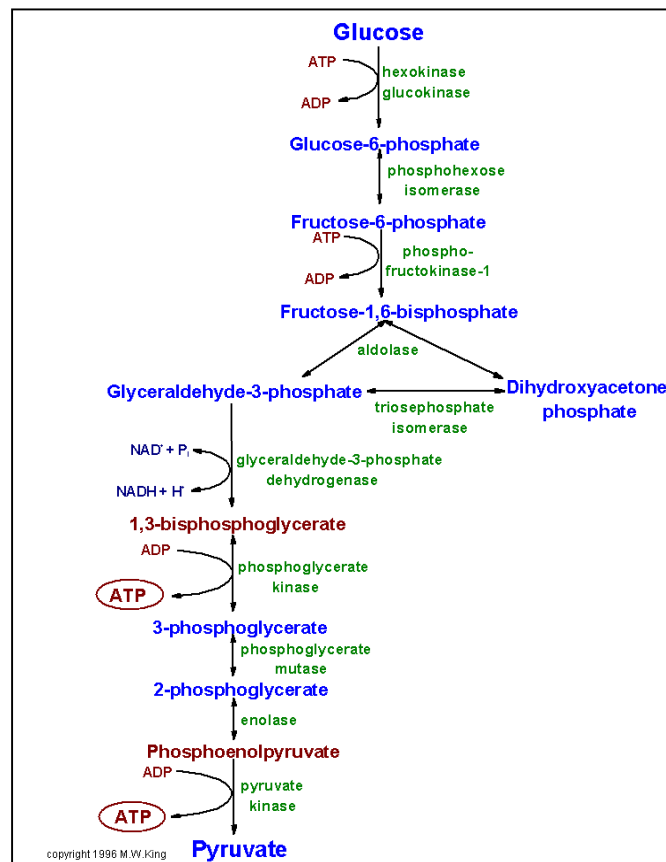


Figure 1. La glycolyse (d'après M.W. King, The Medical Biochemistry Page)

1.1.1.1.2. La synthèse endogène de glucose ou néoglucogénèse

Elle est essentielle pour l'homéostasie de la glycémie en période post-absorptive et durant le jeûne. Le glucose peut être synthétisé au cours de la néoglucogénèse dans le foie à partir du lactate (produit de la fermentation) et de l'alanine (acide aminé glucoformateur), dans le rein, et dans l'intestin grêle (Hanson & Garber, 1972 ; Anderson & Rosendall, 1973 ; Nordlie, 1976) à partir du glycérol et de la glutamine (Croset *et al.*, 2001). Le lactate, le glycérol et les acides aminés glucoformateurs sont convertis en pyruvate qui entre dans la voie de la néoglucogénèse (**figure 2**).

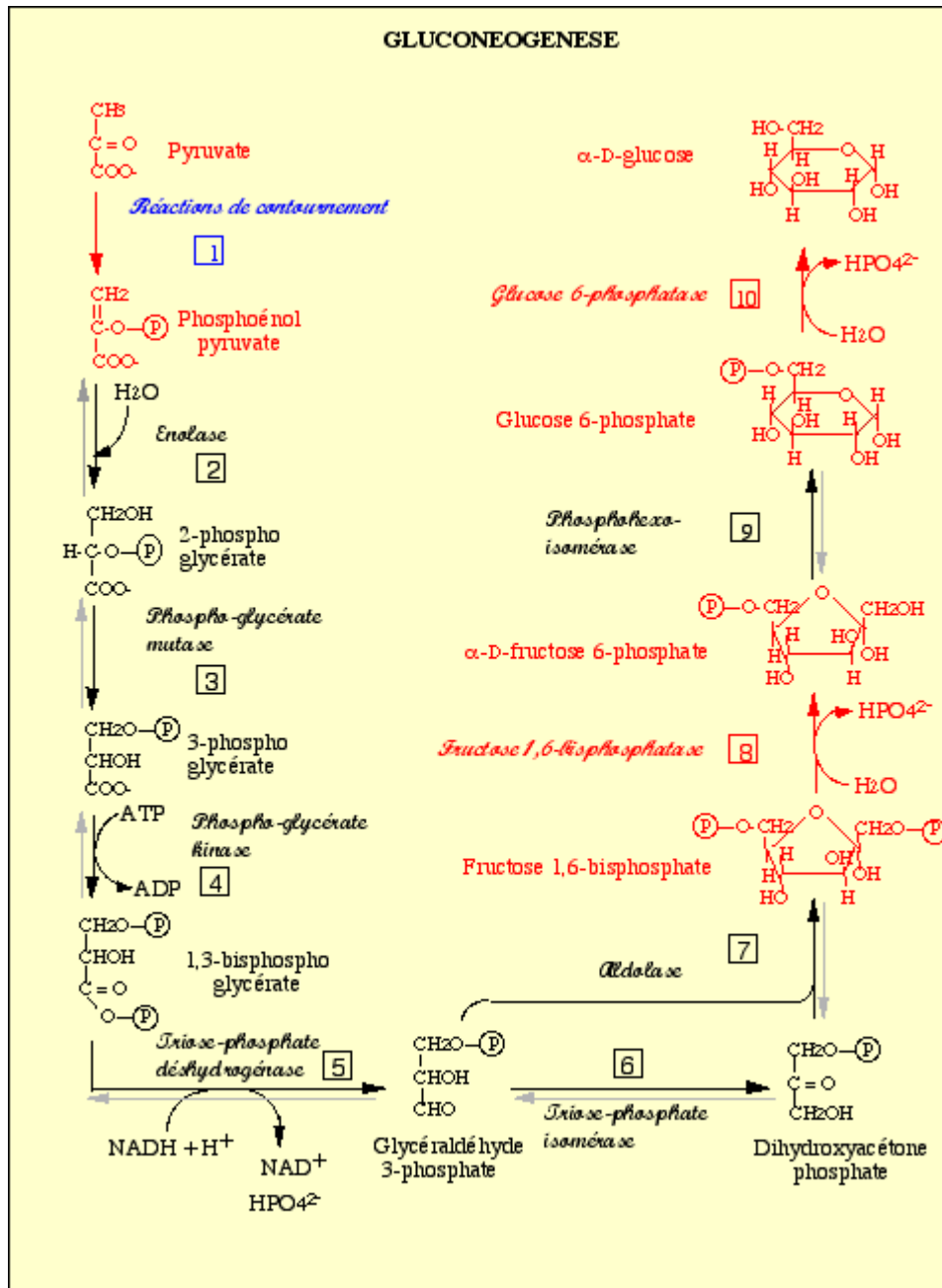
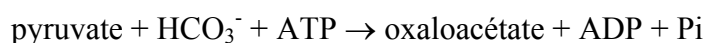
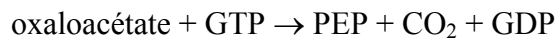


Figure 2. La néoglucogenèse (extrait du site « bmedia » de l'Université Pierre et Marie Curie)

Sur ses dix réactions enzymatiques, sept sont des réactions inverses de la glycolyse. Les étapes 1, 8 et 10 de la néoglucogenèse sont catalysées par des enzymes différentes de celles de la glycolyse. La transformation 1 nécessite plusieurs étapes catalysées par des enzymes mitochondriales et cytosoliques : le pyruvate est tout d'abord transformé en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase, enzyme mitochondriale :



La décarboxylation de l'oxaloacétate par la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), enzyme cytosolique, fournit ensuite l'énergie nécessaire à la synthèse du phosphoénolpyruvate (PEP) :



Les réactions 8 et 10 sont des hydrolyses. La glucose 6-phosphatase (Glc6Pase) catalyse la réaction d'hydrolyse du glucose 6-phosphate en glucose et phosphate inorganique (réaction 10).

Mécanismes impliqués dans la régulation de la PEPCK et de la Glc6Pase :

Le glucagon stimule la transcription des gènes codant pour la PEPCK et la Glc6Pase (Band & Jones, 1980 ; Beale *et al.*, 1984). L'insuline possède un élément de réponse (IRE) au niveau du promoteur des gènes codant pour la PEPCK et la Glc6Pase et inhibe la transcription de ces deux gènes (Streper *et al.*, 1997). Le promoteur du gène codant pour la Glc6Pase possède également un élément de réponse à l'AMPc (CRE) impliqué dans l'activation de la transcription de ce gène par l'AMPc et par les glucocorticoïdes (Schmoll *et al.*, 1999). Enfin, ce promoteur contient des sites de liaison pour des HNFs (hepatocyte nuclear factors) qui interviennent dans l'activation de la transcription du gène par l'AMPc (Lin *et al.*, 1997). Les niveaux de l'expression des gènes codant pour la Glc6Pase et la PEPCK sont aussi régulés par des métabolites. Ainsi, le glucose et le fructose 2,6-biphosphate stimulent la transcription du gène codant pour la Glc6Pase (Argaud *et al.*, 1997), tandis que le glucose inhibe la transcription du gène codant pour la PEPCK (Scott *et al.*, 1998). L'intensité de l'effet stimulateur du glucose dans le cas de la Glc6Pase et inhibiteur dans le cas de la PEPCK est modulée par la quantité de glucokinase (enzyme catalysant la réaction de phosphorylation du glucose en glucose 6-phosphate) présente dans la cellule (Argaud *et al.*, 1997 ; Scott *et al.*, 1998). L'effet stimulateur du glucose sur la transcription du gène codant pour la Glc6Pase est paradoxal et suggère un rôle de cette enzyme dans le transport vésiculaire du glucose dans le cytoplasme des cellules (**cf. 2.3.3.**). Enfin, les acides gras non-estérifiés stimulent la transcription du gène codant pour la PEPCK et entraînent une augmentation de l'activité spécifique de cette enzyme (Forest *et al.*, 1997 ; Tordjman *et al.*, 2003).

1.1.1.2. Les autres substrats énergétiques

1.1.1.2.1. Les lipides

Les triacylglycérols constituent la forme de réserve d'énergie la plus importante chez les animaux. Ce sont des composés obtenus par estérification des fonctions alcool du glycérol par des acides gras. Ils sont principalement stockés dans le tissu adipeux blanc et y subissent continuellement synthèse (non présentée dans ce mémoire) et dégradation (lipolyse).

Le clivage des triacylglycérols au cours de la lipolyse (**figure 3**) aboutit à la libération de molécules de glycérol et d'acides gras non estérifiés. Deux enzymes principales catalysent cette réaction dans le tissu adipeux blanc : la lipase hormono-sensible qui hydrolyse les acides gras des tri- (TAG) et diacylglycérols (DAG), et la monoacylglycérol lipase qui libère le dernier acide gras à partir du monoacylglycérol (MAG) (Belfrage *et al.*, 1984 ; Yeaman, 1990). L'activation de la lipase hormono-sensible est sous le contrôle hormonal des catécholamines : la liaison de l'adrénaline sur les récepteurs membranaires β -adrénergiques conduit à l'activation de l'adénylate cyclase. L'augmentation d'AMP cyclique qui en résulte active une protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle et par conséquent active la lipase hormono-sensible (El Hadri *et al.*, 1996).

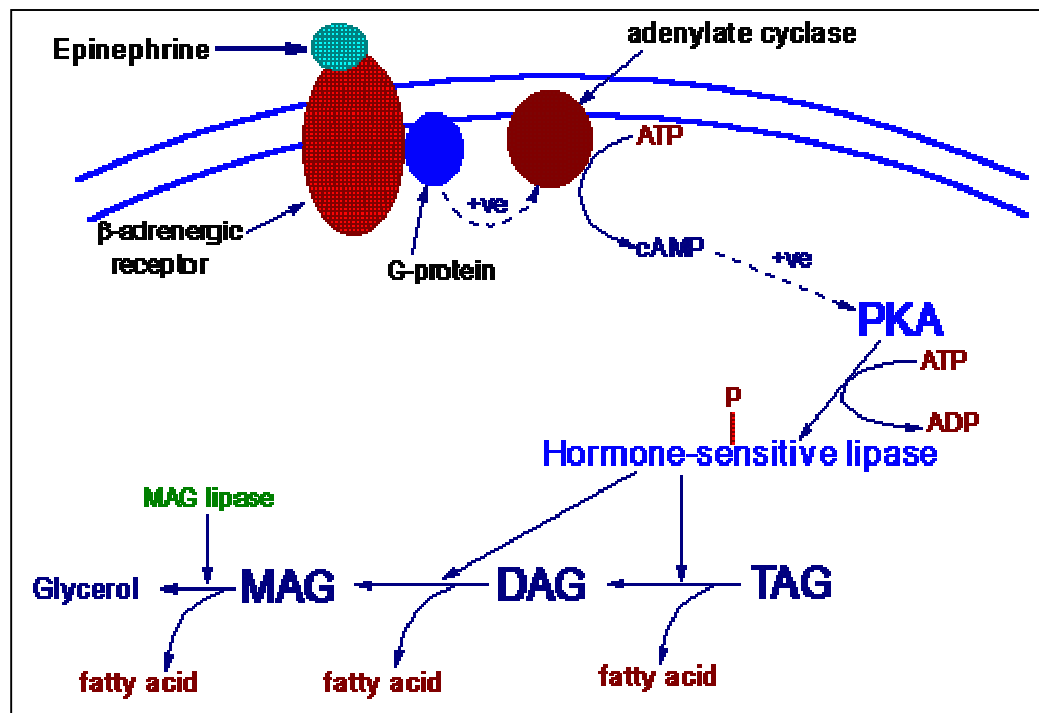


Figure 3. La lipolyse (M.W. King, 1996, The Medical Biochemistry Page)

Le glycérol et les acides gras libérés dans le cytosol diffusent librement dans l'espace interstitiel. Le glycérol est libéré dans le sang et acheminé vers le foie, le rein ou l'intestin grêle où il sert de précurseur à la néoglucogenèse. Les acides gras sont soit libérés dans la circulation sanguine, soit recaptés par les adipocytes, puis activés et réestérifiés (réestérification primaire) en triacylglycérols avec du glycérol provenant du glucose (Edens *et al.*, 1990). Les acides gras libérés dans la circulation sont utilisés comme substrat énergétique par certains tissus comme le foie, les muscles ou le coeur, ou entrent dans la voie de la cétogenèse hépatique.

Au niveau des tissus, les acides gras peuvent traverser la membrane plasmique des cellules soit par diffusion passive au travers de la bicouche lipidique, soit par l'intermédiaire de transporteurs protéiques présents dans la membrane. Trois principaux types de transporteurs ont été identifiés : les FABPpm (plasma membrane Fatty Acid Binding Proteins), les FAT / CD36 (Fatty Acid Translocases) et les FATP (Fatty Acid Transport Protein) (Frohnert & Bernlohr, 2000).

La β -oxydation est le processus par lequel les acides gras sont oxydés. Cette oxydation, lorsqu'elle est intense au niveau du foie, aboutit à l'accumulation d'acétyl-CoA dans la mitochondrie, ce qui déclenche alors la formation des corps cétoniques (cétogenèse). Les acides gras plasmatiques issus de la lipolyse et qui ne sont pas oxydés sont réestérifiés (réestérification secondaire) en triacylglycérols, essentiellement dans le foie (Eaton *et al.*, 1969 ; Basso & Havel, 1970).

En présence de concentrations élevées d'acétyl-CoA, les mitochondries hépatiques synthétisent des corps cétoniques qui constituent un substrat énergétique significatif pour des tissus extra-hépatiques (en particulier le cerveau) lorsque la concentration plasmatique de glucose est faible (Robinson & Williamson, 1980).

1.1.1.2.2. Les protéines

Les acides aminés provenant de l'alimentation ou du catabolisme des protéines musculaires peuvent servir de substrats énergétiques aux cellules. La première étape de l'utilisation des acides aminés est assurée par les réactions de transamination, de désamination ou de synthèse de l'urée, qui séparent le groupement alpha aminé du squelette carboné. Le squelette carboné participe ensuite à la synthèse de glucose *via* la néoglucogenèse ou de corps cétoniques *via* la cétogenèse.

La plupart des acides aminés sont glucoformateurs, c'est-à-dire qu'ils peuvent être convertis en pyruvate ou en produits intermédiaires du cycle de Krebs tels que l' α -céto glutarate ou l'oxaloacétate avant d'entrer dans la voie de la néoglucogenèse.

Par ailleurs, certains acides aminés (lysine, leucine, isoleucine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, tyrosine) pourront être convertis en acétyl-CoA et participeront ainsi à la synthèse des corps cétoniques ou des acides gras. La conversion d'acides aminés en produits intermédiaires du cycle de Krebs et en acétyl-CoA produit de l'ATP (**figure 4**).

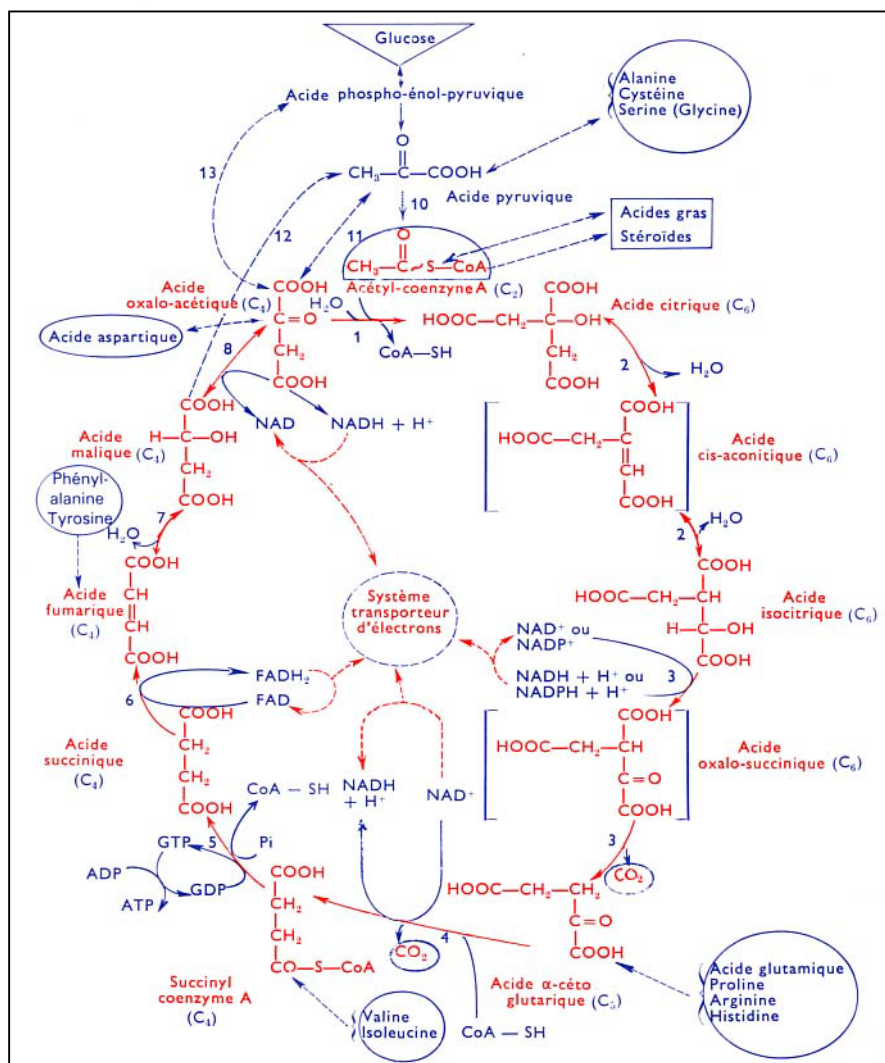


Figure 4. Les réactions du cycle de Krebs, relations avec les glucides, les lipides et les protéines (extrait de Biochimie Générale, J.H. Weil, Ed. Masson)

1.1.2. Régulation de la balance énergétique

Diverses hypothèses ont été émises pour attribuer un rôle éventuel aux réserves énergétiques dans la régulation de la balance énergétique. L'une d'elles met en avant la balance glucidique comme régulateur à court terme de la balance énergétique, essentiellement *via* des ajustements de la prise alimentaire. Ainsi, chez des souris nourries *ad libitum* et stables en masse, les ajustements de prise alimentaire au jour le jour correspondent à un équilibre de la balance glucidique, la prise alimentaire quotidienne impliquant une prise glucidique équivalente à la quantité de glucides oxydés (Flatt, 1991). La quantité de lipides corporels ne serait alors pas sous contrôle et ne serait que la résultante de la quantité d'énergie ingérée lors de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (Jéquier, 1992). Cette hypothèse est toutefois remise en cause par la découverte du rôle limitatif de la leptine (synthétisée par le tissu adipeux blanc) sur la prise alimentaire (Maffei *et al.* 1995).

Une seconde hypothèse privilégie un contrôle de la balance énergétique lié au statut énergétique hépatique. Une baisse des réserves en glycogène associée à une diminution de l'oxydation hépatique des acides gras serait alors le signal de prise alimentaire (Friedman, 1995). Cette hypothèse est en accord avec les études montrant que l'inhibition simultanée de l'oxydation des lipides et des glucides a un effet stimulant sur la prise alimentaire plus marqué que la somme des effets d'inhibitions séparées du catabolisme glucidique et du catabolisme lipidique (Friedman & Tordoff, 1986). La branche hépatique du nerf vague pourrait être impliquée dans la transmission des informations sur le statut énergétique hépatique au système nerveux central (Rossi *et al.*, 1996).

Une troisième hypothèse met l'accent sur la dépense énergétique comme élément régulateur de la balance énergétique. Cette hypothèse se fonde, d'une part sur la corrélation inverse qui peut être observée entre la prise alimentaire et l'activité du système nerveux sympathique, et d'autre part sur le fait que l'activité du système nerveux sympathique est diminuée dans la plupart des modèles d'obésité (Bray, 1991).

1.1.3. Hormones et réserves énergétiques

Les hormones pancréatiques (insuline et glucagon) ont un rôle essentiel dans la gestion des réserves énergétiques de l'organisme. L'insuline, sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, a une action qui favorise le captage cellulaire du glucose circulant. Elle stimule la lipogenèse et la glycogénèse et inhibe la néoglucogénèse. La

sécrétion d'insuline est déclenchée par l'augmentation de la glycémie consécutive à un repas. L'insuline a donc une action anabolique périphérique qui conduit à une mise en réserve des nutriments aussi bien glucidiques que lipidiques et a un effet hypoglycémiant. L'injection répétée d'insuline a également un effet stimulant l'accrétion protéique et la prise alimentaire (Roberts *et al.*, 1994).

Le glucagon, sécrété par les cellules α des îlots de Langerhans du pancréas, a des effets antagonistes de ceux de l'insuline. Il stimule la glycogénolyse, la néoglucogenèse, la lipolyse et la production de corps cétoniques. Il inhibe par contre la glycogénèse, la glycolyse et la lipogénèse. Le glucagon a donc une action catabolique qui conduit à une mobilisation des réserves et il a un effet hyperglycémiant. La sécrétion de glucagon est stimulée par une baisse de la glycémie (Jiang & Zhang, 2003).

Les catécholamines sont sécrétées dans le sang par les médullosurrénales et libérées localement au niveau tissulaire par les terminaisons nerveuses sympathiques lors d'une baisse de la glycémie. Au niveau du foie, l'adrénaline stimule la glycogénolyse et la néoglucogenèse. Au niveau rénal, les catécholamines stimulent la néoglucogenèse et la sécrétion de glucose. Enfin, les catécholamines stimulent la lipolyse des tissus adipeux (Coppack *et al.*, 1994). Elles ont donc une action favorisant la mobilisation des réserves énergétiques.

Les glucocorticoïdes (corticostérone chez le rat), sécrétés par les corticosurrénales, ont une action qui est dose-dépendante. L'action de la corticostérone à basse concentration serait anabolique et stimulerait l'accrétion lipidique (*via* les récepteurs de type I à haute affinité). L'action de la corticostérone à haute dose serait par contre catabolique (*via* les récepteurs de type II à basse affinité ; Woodward & Emery, 1989). Elle aurait pour effet d'inhiber la synthèse protéique, de stimuler le catabolisme protéique et la néoglucogenèse à partir des acides aminés libérés par l'hydrolyse des protéines.

1.2. Balance énergétique négative

Une balance énergétique négative se traduit par un amaigrissement. Hormis les modèles pathologiques, les modèles expérimentaux de balance énergétique négative consistent le plus souvent à réduire ou à supprimer la prise alimentaire des animaux. Il existe également des modèles expérimentaux de balance énergétique négative après lésion des aires hypothalamiques latérales (Hirvonen & Keeseey, 1996) ou du fait d'une activité locomotrice

forcée induisant une anorexie (Burden *et al.*, 1993). Ces deux derniers modèles ne seront pas abordés ici.

1.2.1. Utilisation des réserves énergétiques au cours du jeûne

1.2.1.1. Les trois phases métaboliques du jeûne

Trois phases de jeûne ont été initialement décrites chez des oiseaux jeûnant spontanément dans leur milieu naturel, en fonction de l'évolution de leur masse corporelle (Le Maho *et al.*, 1976) et de changements métaboliques, hormonaux et comportementaux (Cherel & Le Maho, 1985 ; Cherel *et al.*, 1988a). Ces variations sont également observées lors d'un jeûne expérimental chez le rat de laboratoire (**figure 5**) (Goodman *et al.*, 1980 ; Goodman *et al.*, 1982 ; Cherel *et al.*, 1991).

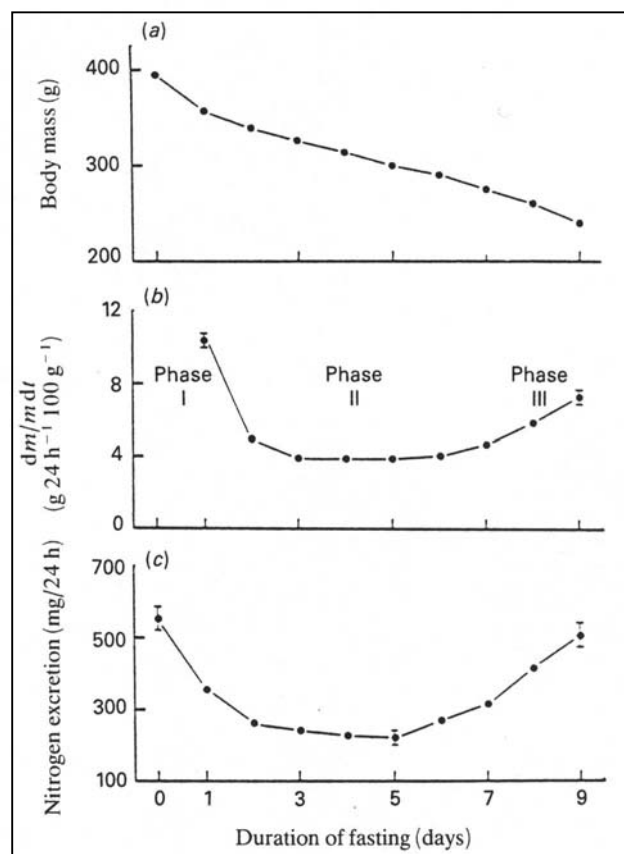


Figure 5. Evolution de la masse corporelle (a), de la perte de masse journalière dm/mdt (b) et de l'excrétion d'azote (c) au cours du jeûne chez le rat. L'excrétion d'azote reflète le catabolisme des protéines corporelles (d'après Cherel *et al.*, 1991).

1.2.1.1.1. La première phase d'adaptation au jeûne (phase I)

Cette phase est courte (quelques heures chez le rat). Elle se caractérise par une perte de masse très rapide liée à la vidange du tractus digestif et à l'utilisation des réserves glucidiques de l'organisme. Lorsque la quantité de glycogène hépatique s'avère insuffisante pour couvrir les besoins en substrats des cellules, les réserves adipeuses de l'organisme vont fournir des acides gras, la production de corps cétoniques restant basse. En conséquence, le taux circulant d'acides gras non-estérifiés est augmenté (Bnouham, 1995) et la glycémie légèrement diminuée (Rao, 1995).

La restriction alimentaire induit également une diminution du développement musculaire par inhibition de la synthèse protéique (Schadereit *et al.*, 1995), les muscles riches en fibres blanches étant plus sensibles que les muscles riches en fibres rouges (Shorey *et al.*, 1992 et 1993).

1.2.1.1.2. La phase II

Au cours de cette phase, la vitesse de perte de masse corporelle est constante. Les acides gras non-estérifiés fournissent la majorité de l'énergie utilisée par l'organisme, que ce soit par une oxydation directe ou par la transformation puis l'oxydation de corps cétoniques (Belkhou *et al.*, 1991). Cette intense utilisation des lipides entraîne une forte augmentation du glycérol et surtout des acides gras, mais également des corps cétoniques plasmatiques (Goodman *et al.*, 1980 ; Cherel *et al.*, 1988b et 1992). Les acides gras libres et les corps cétoniques circulants auraient un effet inhibiteur sur la néoglucogenèse, favorisant ainsi une épargne protéique (Féry *et al.*, 1996). L'épargne protéique pendant cette phase se traduit par une faible concentration plasmatique en urée et une faible excrétion azotée (Goodman *et al.*, 1980 ; Cherel *et al.*, 1988b et 1992).

1.2.1.1.3. La phase III

Au-delà de la perte de 75% des réserves lipidiques initiales, la part des protéines dans la fourniture de substrat énergétique augmente fortement (Belkhou *et al.*, 1991). Les protéines corporelles sont catabolisées, tandis que la synthèse protéique est réduite (Cherel *et al.*, 1991). L'urémie est par conséquent augmentée (Goodman *et al.*, 1980 ; Lowell & Goodman, 1987 ; Cherel *et al.*, 1988b). Un accroissement du taux plasmatiques des acides aminés totaux a également été observé. Parallèlement, une diminution de la concentration plasmatique des corps cétoniques et des acides gras traduit une réduction de la contribution des lipides à la dépense énergétique (Goodman *et al.*, 1980 ; Lowell & Goodman, 1987 ; Cherel *et al.*,

1988b). Les acides aminés sont alors utilisés afin de fournir de l'énergie à l'organisme, en particulier sous forme de glucose (par la voie de la néoglucogenèse). La phase III est marquée par une augmentation soudaine et très rapide de la vitesse de perte de masse corporelle.

1.2.2. Déséquilibre de la balance énergétique

Le jeûne est accompagné d'une diminution de la dépense énergétique de l'organisme (Forsum *et al.*, 1981). Cette diminution s'explique tout d'abord par la diminution de la masse protéique qui est la principale masse métaboliquement active. La diminution de la dépense énergétique est cependant plus importante que la valeur pouvant être estimée à partir de la réduction de la masse protéique et elle subsiste lors de la réalimentation (Dulloo & Calokatisa, 1991 ; Luke & Schoeller, 1992 ; Dulloo & Girardier, 1993). Lors d'une restriction alimentaire, la thermogenèse induite par l'alimentation est diminuée, améliorant ainsi l'efficacité alimentaire (Boyle *et al.*, 1981). L'activité du système nerveux sympathique est également diminuée lors d'une restriction alimentaire (Rothwell & Stock, 1982) et lors d'un jeûne total (Gotoh, 1996). La diminution de l'activité du système nerveux sympathique peut expliquer la part de la diminution de la dépense énergétique qui n'est pas due à la diminution de la masse maigre durant la période de restriction alimentaire, ce qui ne semble pas être le cas durant la période de réalimentation (Dulloo *et al.*, 1995).

Une augmentation de l'activité locomotrice a été observée chez des rats en phase III de jeûne lors de l'atteinte d'un seuil critique de déplétion des réserves lipidiques (Sclafani & Rendel, 1978 ; Koubi *et al.*, 1991 ; Challet *et al.*, 1995). Cette activité est supprimée chez des rats surrénalectomisés et restaurée après traitement de ces rats à la corticostérone (Challet *et al.*, 1995). L'augmentation de l'activité locomotrice dès l'entrée des animaux en phase III de jeûne correspond à un mécanisme général qui, chez l'animal dans son milieu naturel, va induire un comportement de recherche alimentaire (Robin *et al.*, 1988). L'hypothèse d'un signal de réalimentation associé à la transition entre les phases II et III a été avancée (Koubi *et al.*, 1991 ; Robin *et al.*, 1998). Ce signal, qui stimulerait la réalimentation spontanée de l'animal avant la déplétion létale de ses réserves énergétiques, correspond très probablement à un ensemble coordonné de modifications métaboliques (cf. 1.2.1.1.2. et 1.2.1.1.3.) et hormonales (cf. 1.2.3.) et comprend aussi certainement une composante centrale comme en témoigne l'augmentation de l'expression génique des neuropeptides hypothalamiques orexigènes en début de phase III du jeûne (Bertile *et al.*, 2003).

Parallèlement, une augmentation du métabolisme de repos a été mesurée chez des patientes en stade avancé d'anorexie mentale (Rigaud *et al.*, 2000). Cette augmentation est associée à une importante excrétion azotée, à des concentrations plasmatiques d'acides gras et de glucose très basses et à un épuisement de la masse adipeuse. Elle pourrait être liée à une augmentation de la perméabilité des membranes mitochondriales qui induirait une baisse de l'efficacité de la phosphorylation oxydative et par conséquent une augmentation de la consommation d'oxygène.

1.2.3. Modifications hormonales

Une restriction alimentaire induit une baisse de l'insulinémie et de la glucagonémie, le rapport insuline / glucagon restant inchangé en dépit de l'hypoglycémie (Rao, 1995). Lors d'un jeûne total, l'insulinémie diminue régulièrement tout le temps que dure le jeûne (Cherel *et al.*, 1988b). Par contre, la glucagonémie augmente lorsque le jeûne se prolonge, ce qui conduit à une diminution du rapport insuline / glucagon.

La corticostéronémie augmente lors d'une restriction alimentaire (Pirke *et al.*, 1993) et lors d'un jeûne total (Belkhou *et al.*, 1991), notamment lors de l'accélération de l'utilisation des protéines corporelles en fin de jeûne. Cette accélération est supprimée par surrénalectomie et réapparaît après un traitement à la corticostérone (Challet *et al.*, 1995) (**figure 6**). Le catabolisme protéique est réduit chez des rats à jeun traités au RU486, un antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes de type II. Ce résultat indique que le catabolisme protéique est induit par la fixation de la corticostérone sur les récepteurs de type II (Challet *et al.*, 1995).

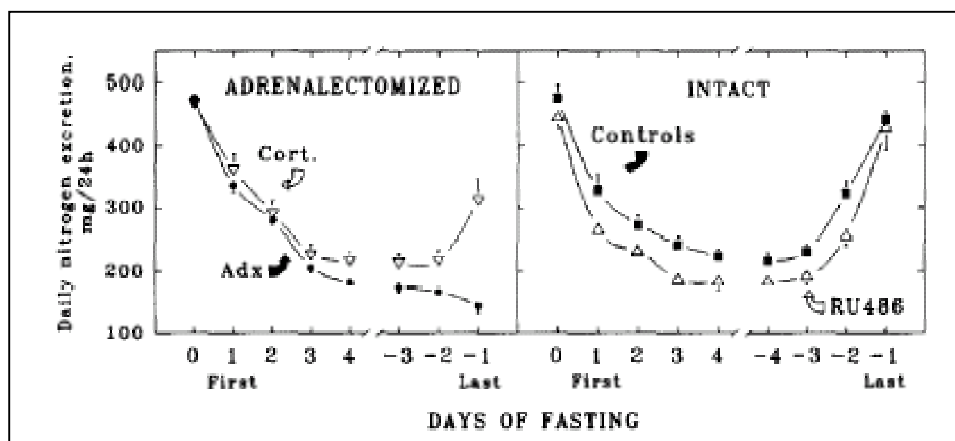


Figure 6. Effets du jeûne sur l'excrétion d'azote chez le rat. Jour 0 : état nourri. Jour 1 : début du jeûne. Adx : rats surrénalectomisés ; Cort : rats traités à la corticostérone après surrénalectomie ; RU486 : rats traités au RU486. Pendant toute la durée du jeûne, l'excrétion d'azote est plus basse chez les rats traités au RU486 et chez les rats surrénalectomisés. L'injection de corticostérone aux rats surrénalectomisés entraîne une augmentation de

l'excrétion d'azote qui est alors égale à la valeur contrôle. L'augmentation finale de l'excrétion d'azote chez les rats contrôles et traités au RU486 est caractéristique de la phase III. Les rats surrénalectomisés ne présentent pas cette augmentation. Par contre, l'injection de corticostérone la restaure (**d'après Challet *et al.*, 1995**).

Lorsque des animaux en restriction alimentaire reçoivent leur nourriture en un seul repas durant la phase diurne, il apparaît un pic de corticostérone anticipant la prise de nourriture. Chez le rat, ce pic s'ajoute au pic nocturne habituellement observé (Pirke *et al.*, 1993; Challet, 1996).

La diminution de la leptinémie dès le début du jeûne serait impliquée dans l'adaptation au jeûne (Ahima *et al.*, 1996 ; Ahima, 2000). En effet, elle est parfaitement corrélée à la diminution de l'adiposité et est donc un bon indicateur de changements de l'état des réserves corporelles (Maffei *et al.*, 1995 ; Frederich *et al.*, 1995). Par ailleurs, la leptine stimule l'expression génique et la synthèse de neuropeptides anorexigènes et inhibe celles des neuropeptides orexigènes (Inui & Meguid, 2003). Elle entraîne notamment une diminution du niveau de l'expression des gènes codant pour les neuropeptides orexigènes orexine (Yamanaka *et al.*, 2003) et neuropeptide Y (Ahima *et al.*, 1996 ; Legradi *et al.*, 1997). Une injection intracérébroventriculaire d'orexine à des rongeurs induit une augmentation de la corticostéronémie (Hagan *et al.*, 1999), de l'activité locomotrice (Nakamura *et al.*, 2000) et du métabolisme énergétique (Lubkin & Stricker-Krongrad, 1998). En phase III du jeûne cependant, alors que la leptinémie est très basse, seule l'expression génique du neuropeptide Y augmente, le niveau de l'expression génique de la prépro-orexine, peptide précurseur de l'orexine, restant inchangé par rapport à celui de rats nourris *ad libitum* (Bertile *et al.*, 2003). La leptine est enfin à l'origine d'une hyperactivité chez des patientes souffrant d'anorexie nerveuse et chez des rats à jeun (Hebebrand *et al.*, 2003).

Le taux circulant de noradrénaline ne semble pas modifié par une restriction alimentaire (Burden *et al.*, 1993) mais est diminué lors d'un jeûne total (De Boer *et al.*, 1989).

Le taux plasmatique de triiodothyronine est diminué lors d'une restriction alimentaire (Pirke *et al.*, 1993) et lors d'un jeûne total (Belkhou *et al.*, 1991).

1.3. Balance énergétique positive

Une balance énergétique positive va se traduire par un gain de masse qui, à l'extrême, conduit à une obésité. Je n'aborderai pas ici le modèle de l'obésité et limiterai mon exposé à la restauration des réserves corporelles après un jeûne.

1.3.1. Réserves et substrats énergétiques

La réalimentation consécutive à un jeûne total entraîne la restauration du glycogène hépatique puis musculaire, une accrétion lipidique, une réhydratation tissulaire et un gain de masse protéique (Bjorntorp *et al.*, 1982).

Bien que le glycogène hépatique soit restauré après seulement 8 à 24h de réalimentation suite à un jeûne de 48h, il existe au moment de la transition jeûne-réalimentation une compétition entre la fourniture de glucose à l'organisme et la restauration des réserves de glycogène (Sugden *et al.*, 1989). Les premiers sites d'utilisation du glucose sont donc extra-hépatiques.

La quantité de glycogène stockée dans le foie et dans le muscle chez le rat après 24h de réalimentation atteint jusqu'à trois fois la quantité d'avant le jeûne (McDonald & Johnson, 1965 ; Fréminet, 1981 ; Bjorntorp *et al.*, 1982), puis elle retourne progressivement à la normale (Bjorntorp *et al.*, 1982).

La quantité de lipides stockée est supérieure à la quantité ingérée. Ceci est dû à une importante lipogenèse hépatique à partir des glucides ingérés. Les lipides synthétisés *de novo* sont ensuite acheminés vers leur lieu de stockage (le tissu adipeux essentiellement) (Bjorntorp *et al.*, 1982 ; Dulloo & Girardier, 1990).

La composition de la réalimentation influence la restauration des réserves énergétiques. Une réalimentation enrichie en protéines et en oligopeptides en particulier, stimule par exemple la synthèse des protéines dans le muscle squelettique et le foie (Yoshizawa *et al.*, 1998 ; Boza *et al.*, 2000).

L'accrétion lipidique est plus rapide chez des rats réalimentés après un jeûne de phase III qu'après un jeûne de phase II, et ce grâce à une meilleure efficacité alimentaire (énergie stockée par rapport à l'énergie ingérée) (Decrock *et al.*, 1998). A l'inverse, les protéines corporelles sont plus rapidement restaurées chez des rats ayant subi un jeûne de phase II que chez ceux ayant jeûné jusqu'en phase III. Lorsque les rats des deux groupes ont regagné leur

masse protéique d'avant le jeûne, leurs réserves lipidiques ne sont que partiellement restaurées (40% après un jeûne de phase II et 76% après un jeûne de phase III).

1.3.2. Déséquilibre de la balance énergétique

Au cours de la réalimentation, une augmentation de masse corporelle essentiellement liée à une accrétion lipidique permet le maintien à un niveau bas de la dépense énergétique (Dulloo *et al.*, 1995).

1.3.3. Modifications hormonales et du niveau de l'expression génique des neuropeptides

La réalimentation consécutive à une phase III de jeûne entraîne le retour à un niveau basal de la concentration plasmatique de corticostérone (Belkhou *et al.*, 1991). Par contre, l'insulinémie augmente chez des rats réalimentés 6h après 48h de jeûne et inhiberait l'activité de la glucose-6-phosphatase hépatique et par conséquent la production de glucose (Daniele *et al.*, 1999).

Le niveau de l'expression génique de neuropeptides orexigènes est normalisé après un jour de réalimentation suite à une phase II et à une phase III de jeûne (Bertile *et al.*, 2003).

2. L'intestin grêle

L'intestin grêle est un organe important du système digestif, tant par sa taille et sa surface d'échange que par ses fonctions d'hydrolyse et d'absorption des aliments. Il synthétise jusqu'à 10% des protéines totales de l'organisme et son fonctionnement représente 20 à 30% du métabolisme de base (Cant *et al.*, 1996).

2.1. Anatomie et histologie

Situé dans la cavité abdominale, l'intestin grêle se compose de trois parties présentant des caractéristiques structurales et fonctionnelles propres : le duodénum (il sécrète des enzymes

digestives et reçoit les sécrétions hépatiques et pancréatiques), le jéjunum (il sécrète des enzymes digestives et absorbe les nutriments), et l'iléum (il absorbe les aliments digérés).

La digestion et l'absorption intestinales sont favorisées par l'amplification considérable de la surface d'échange grâce à l'importante longueur de l'intestin grêle replié en anses intestinales, à l'existence à la surface de la paroi intestinale de plis circulaires macroscopiques, les valvules conniventes, à la présence d'innombrables petites évaginations de la muqueuse, les villosités intestinales, et enfin aux microvillosités des entérocytes (**figure 7**). Chez le rat, les villosités permettent d'augmenter la surface de l'intestin grêle de 5 à 10 fois et les microvillosités de 50 à 80 fois (Ferraris *et al.*, 1989).

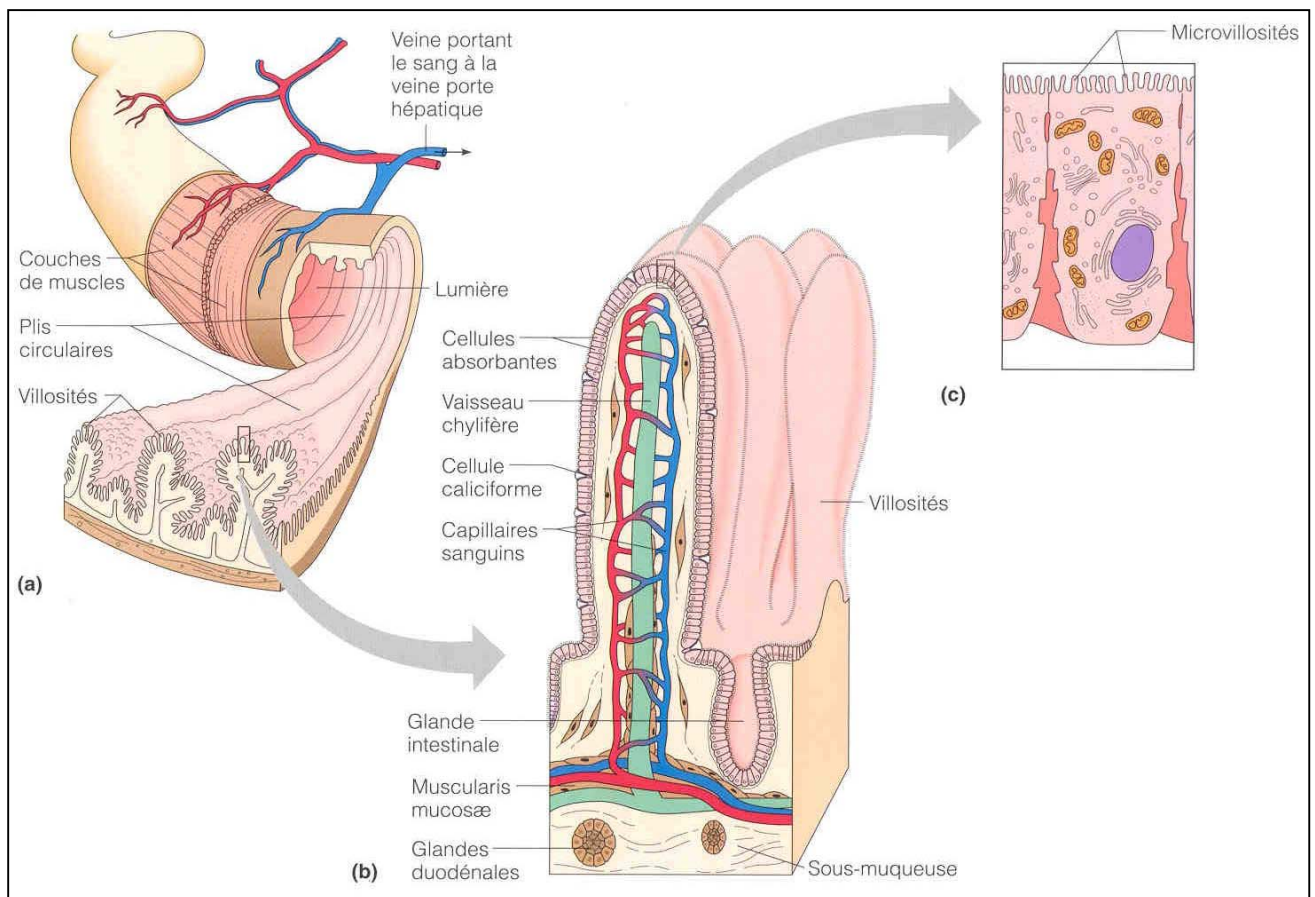


Figure 7. Structure de l'intestin grêle, amplification de la surface d'échange

La paroi de l'intestin grêle est formée de plusieurs couches qui sont, de la lumière du tube vers la séreuse : la muqueuse, la *muscularis mucosae*, la sous-muqueuse et la musculueuse. La muqueuse est elle-même composée de trois couches : les villosités, les glandes ou cryptes de Lieberkühn et la couche lymphoïde, concentration de lymphocytes (**figure 8**).

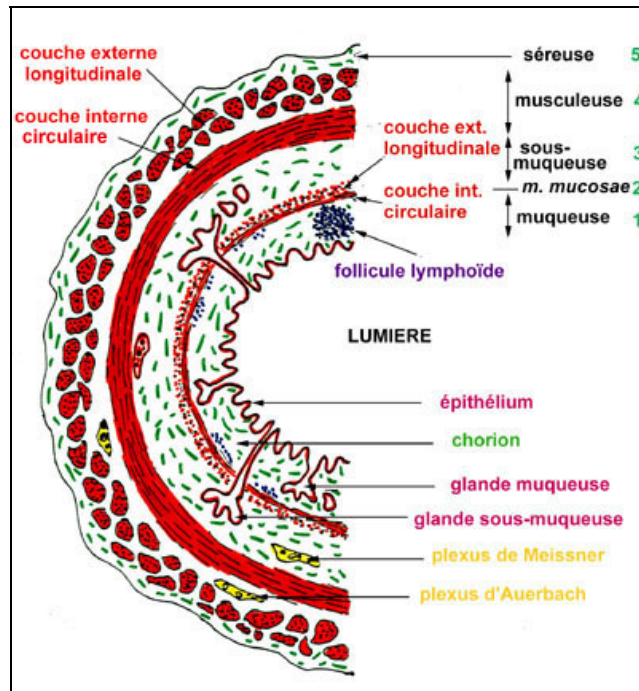


Figure 8. Structure de la paroi intestinale (N. Vacheret, UCB Lyon)

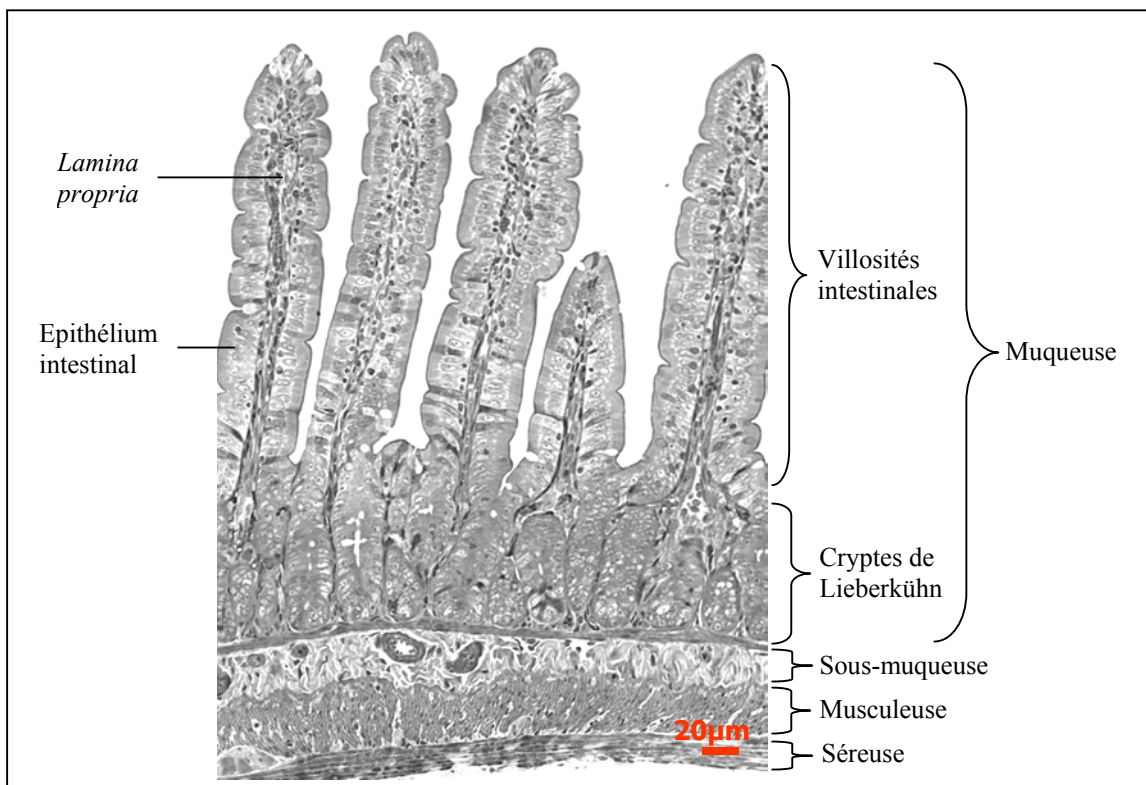


Figure 9. Structure de la muqueuse intestinale

Chaque villosité comprend un épithélium de revêtement et un axe conjonctif, la *lamina propria*. L'épithélium des villosités est prismatique simple et comprend trois types cellulaires : les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules endocrines. L'épithélium des glandes de Lieberkühn comporte deux types de cellules : des cellules indifférenciées prolifératives et des cellules de Paneth situées au fond des glandes (**figures 9 et 10**).

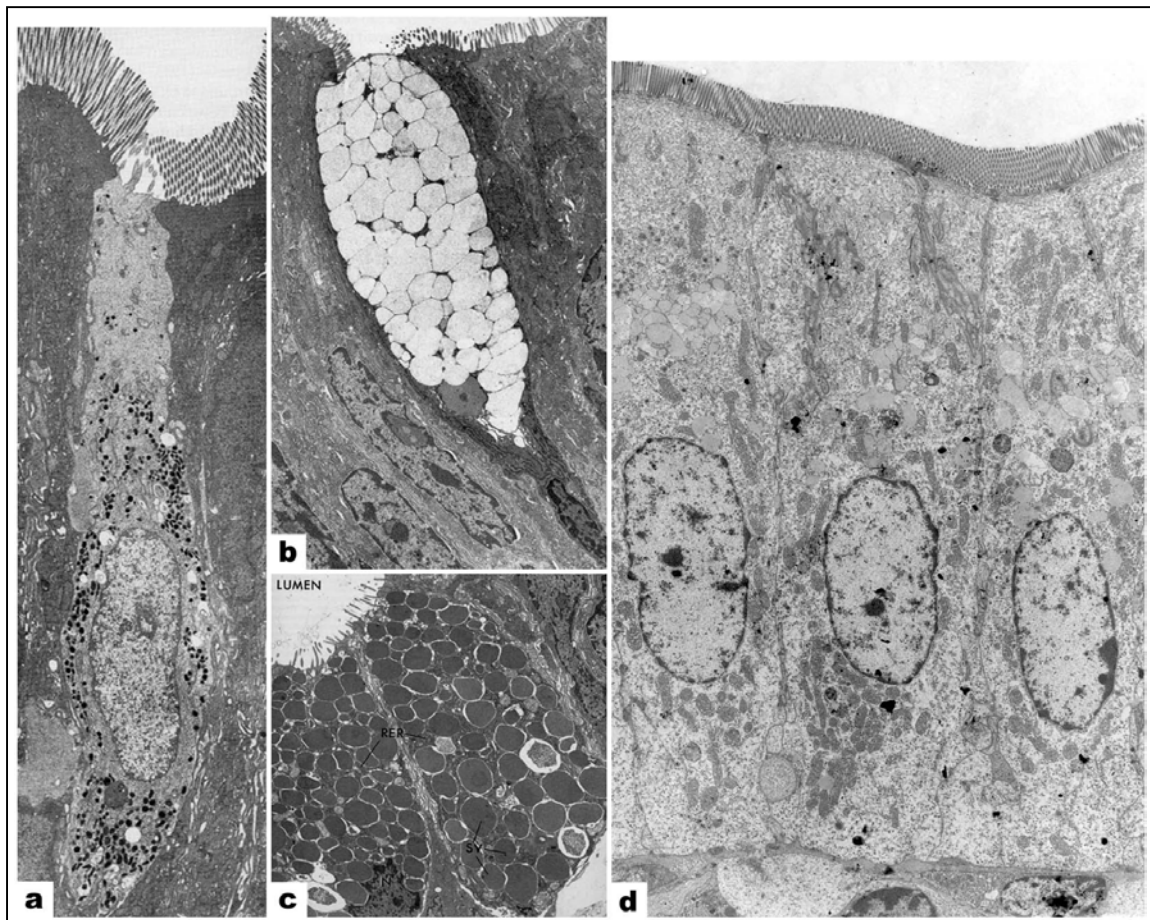


Figure 10. Types cellulaires constitutifs de l'épithélium intestinal : cellule endocrine (a), cellule à mucus (b), cellules de Paneth (c) (RER : réticulum endoplasmique rugueux, SV : vésicules sécrétoires), entérocytes (d) x3500 (photographies a, b et c extraites de Madara & Trier, 1987).

Les entérocytes représentent plus de 90% de la population cellulaire de la muqueuse intestinale et assurent des fonctions de digestion et d'absorption des aliments. **Les cellules caliciformes** ou à mucus représentent moins de 10% des cellules totales, mais leur densité est plus élevée au niveau de l'iléon qu'au niveau du duodénum. Leur fonction principale est de synthétiser et sécréter du mucus qui protège l'épithélium intestinal des enzymes intraluminales, des substances nocives et de la flore pathogène, et qui permet la progression du bol alimentaire. De plus, elles synthétisent un peptide ITF (Intestinal Trefoil Factor), qui

est impliqué dans la régénération de l'épithélium lésé. **Les cellules de Paneth** élaborent des granules contenant des lysozymes, des immunoglobulines et des défensines : les cryptines. De par leur action sécrétoire dans la lumière intestinale, elles participent au maintien d'une barrière anti-microbienne et à la régulation de la flore intestinale. **Les cellules endocrines** dispersées dans tout l'épithélium intestinal produisent des peptides régulateurs de la fonction digestive [sérotonine (contraction du muscle lisse), entéroglucagon, gastrine (stimulation de la sécrétion pancréatique, contraction du muscle lisse), somatostatine, sécrétine (inhibition de la sécrétion d'HCl, stimulation de la sécrétion pancréatique), cholécystokinine, VIP (vasoactive intestinal peptide), GIP (gastric inhibitory peptide), substance P, bombésine].

La *lamina propria* est constituée de tissu conjonctif lâche, d'un chylifère central, capillaire lymphatique en cul de sac, et de fibres musculaires lisses issues de la couche interne de la *muscularis mucosae*, dont les contractions favorisent le contact de l'épithélium intestinal avec le chyme ainsi que le drainage lymphatique dans le chylifère central.

2.2. Renouveau cellulaire de l'épithélium intestinal

2.2.1. Prolifération cellulaire

L'intestin grêle se caractérise par une grande plasticité morphologique et fonctionnelle, et ce, notamment grâce à son renouvellement cellulaire très rapide (Potten, 1994). Les cellules souches se divisent activement dans les cryptes de Lieberkühn (Potten *et al.*, 1997 ; Potten, 1998). Les cellules issues des divisions migrent ensuite des cryptes vers les villosités, grâce aux contractions des muscles lisses de la *lamina propria* (Moore *et al.*, 1989 ; Blikslager & Roberts, 1997). A la base des villosités, les cellules se différencient en entérocytes, en cellules à mucus, ou en cellules endocrines (Madara & Trier, 1987).

2.2.2. Apoptose

Après trois à cinq jours d'existence, les entérocytes meurent par apoptose au sommet des villosités, et sont extrudés dans la lumière intestinale (Luciano *et al.*, 1995 ; Shibahara *et al.*, 1995 ; Wilson & Potten, 1997 ; Holt *et al.*, 1998 ; Westcarr *et al.*, 1999). A l'état nourri, la prolifération cellulaire dans les cryptes équilibre la destruction des cellules au sommet des villosités, ce qui contribue au maintien de l'intégrité de l'épithélium intestinal (Potten & Allen, 1977).

Les changements morphologiques induits par l'apoptose au niveau des entérocytes sont bien connus (Luciano *et al.*, 1997 ; Grossmann *et al.*, 1998 ; Shibahara *et al.*, 1995 ; Potten, 1997 ; Westcarr *et al.*, 1999 ; Aschoff *et al.*, 2000 ; Marshman *et al.*, 2001, Grossmann *et al.*, 2002). Ils se caractérisent par la perte des contacts cellulaires, le détachement de la bordure en brosse (Luciano *et al.*, 1997), le rétrécissement de la cellule qui présente de nombreuses vacuoles intracytoplasmiques, ainsi que la condensation et la fragmentation de son noyau (Shibahara *et al.*, 1995). Les entérocytes en apoptose sont principalement localisés au sommet des villosités (Westcarr *et al.*, 1999 ; Grossmann *et al.*, 2002 ; Groos *et al.*, 2003). Cela dit, quelques études décrivent également la présence de cellules en apoptose dans les cryptes (Potten, 1997 ; Marshman *et al.*, 2001).

Les changements morphologiques résultent d'une cascade d'événements biochimiques (Huppertz *et al.*, 1999). Cette cascade est initiée par la liaison de cytokines ou de facteurs de croissance sur leurs récepteurs qui entraîne l'activation de caspases (Cysteinyl-aspartic acid proteases). Les caspases activées dégradent une variété de protéines du cytosquelette dont l'actine (Kayalar *et al.*, 1996) et les cytokératines (Caulin *et al.*, 1997), induisant ainsi le rétrécissement des entérocytes. Les caspases clivent également les protéines nucléaires et activent des nucléases qui fragmentent l'ADN de la cellule. L'action des caspases sur des translocases induit l'externalisation de phosphatidylsérine qui agit comme un signal de reconnaissance pour les macrophages (Martin *et al.*, 1995). Enfin, les caspases sont responsables de la délocalisation de certaines protéines comme la transglutaminase II sous la membrane cytoplasmique, afin d'éviter l'efflux des composants cytoplasmiques (Fesus *et al.*, 1996).

2.2.3. Régulation des mécanismes cellulaires de l'épithélium intestinal

Les mécanismes contrôlant la prolifération, la migration et l'apoptose des cellules intestinales sont encore largement méconnus. Des nutriments, hormones, facteurs de croissance, cytokines et le système nerveux participeraient à cette régulation.

2.2.3.1. Régulation nerveuse

Les études portant sur le rôle du système nerveux autonome dans le renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal sont contradictoires. Une sympathectomie (Tutton & Helme, 1974 ; Lachat & Gonçalves, 1978 ; Klein, 1979) ou une parasympathectomie (Musso *et al.*, 1975) inhiberaient l'activité mitotique dans les cryptes et ralentiraient la migration des

cellules des cryptes dans les villosités. Holle *et al.* (1989) ont montré à l'inverse, que la suppression des afférences sympathiques stimule la prolifération des cellules intestinales. Enfin, une lésion du plexus myentérique activerait la prolifération et la migration cellulaires (See *et al.*, 1990 ; Holle, 1991 ; Hernandes *et al.*, 2000).

2.2.3.2. Régulation par des facteurs de croissance et de transcription

IGF-I (Insulin-like Growth Factor I), EGF (Epidermal Growth Factor) et TGF- α (Transforming Growth Factor α) stimulent les divisions cellulaires de l'épithélium intestinal (Acra *et al.*, 1998). TGF- β 1 au contraire inhibe la synthèse de cycline D1, ce qui interrompt les divisions cellulaires (Ko *et al.*, 1998). TGF- β 1 exerce également un rôle pro-apoptotique en régulant la transcription de gènes de l'apoptose tels que ceux codant pour les protéines de la famille des Bcl-2 (Hague *et al.*, 1998). TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) est une autre cytokine qui entraîne également l'apoptose des entérocytes et qui inhibe (à hautes doses) ou stimule (à faible doses) la prolifération cellulaire (Trauth *et al.*, 1989 ; Fesus, 1993 ; Hsu *et al.*, 1996 ; Kaiser & Polk, 1997 ; Diab-Assef *et al.*, 2002). Cdx2 (Caudal-related homeodomain protein) enfin, entraîne une diminution de la prolifération des cellules intestinales et stimule leur différenciation et leur apoptose (Suh *et al.*, 1994 ; Suh & Traber, 1996 ; Lorentz *et al.*, 1997 ; Freund *et al.*, 1998).

2.2.3.3. Régulation hormonale

L'insuline régule la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal en inhibant *via* TGF- β 1, les effets pro-mitotiques d'IGF-I. Les cellules sont alors bloquées en phase G1 du cycle cellulaire et se différencient (Kojima *et al.*, 1998). Des peptides intestinaux (entérogucagon, glucagon-like peptide-2 GLP-2, etc...) stimulent la prolifération des cellules et exercent généralement un effet anti-apoptotique. Les glucocorticoïdes stimuleraient également la prolifération et inhiberaient l'apoptose des cellules épithéliales de l'intestin grêle (Foligne *et al.*, 2001).

2.2.3.4. Régulation par les nutriments

Une malnutrition, des carences en protéines, acides gras essentiels, folate, zinc, vitamine A, B12, sont connues pour inhiber la croissance et le renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal (Williamson, 1978 ; Ziegler *et al.*, 1999 et 2003). La quantité et la qualité des aliments ingérés interviennent en effet dans la régulation de la sécrétion des

hormones et des facteurs de croissance gastro-intestinaux impliqués dans la croissance de l'épithélium, telles que la gastrine, IGF-I et EGF (Ziegler *et al.*, 1999). Le lait par exemple, est particulièrement riche en facteurs de croissance (Growth Hormone GH, IGF-I, insuline, prolactine, EGF) qui, par leur interaction avec des récepteurs spécifiques de la muqueuse, stimulent la régénération de l'épithélium et l'absorption intestinale. La glutamine est un substrat majeur pour les cellules de l'épithélium intestinal et stimule leur renouvellement (Ziegler *et al.*, 2000). Les polyamines sont également indispensables aux cellules en division (Johnson, 1988). Elles sont apportées par l'alimentation mais sont aussi synthétisées par la flore microbienne intestinale ou proviennent de cellules apoptotiques. La synthèse endogène de polyamines est réalisée par l'ornithine décarboxylase qui est stimulée par l'alimentation (Tabata *et al.*, 1986) mais aussi par EGF, l'insuline, la gastrine, etc... Les acides gras n-3 diminuent les taux circulants de cytokines pro-inflammatoires (TNF, interleukine-1 β IL-1 β) et par conséquent leurs effets anti-prolifératif et pro-apoptotique sur la muqueuse intestinale (Nieto *et al.*, 2002). Le zinc enfin, inhibe l'apoptose des cellules intestinales (Blanchard *et al.*, 2001).

2.3. Mécanismes de l'absorption intestinale

En période postprandiale, les nutriments, les électrolytes et l'eau contenus dans la lumière intestinale sont absorbés au pôle apical des entérocytes puis repris par la circulation systémique au niveau de leur pôle basal, et distribués dans tout l'organisme.

2.3.1. Absorption de l'eau et des électrolytes

2.3.1.1. Perméabilité passive aux ions et à l'eau

L'épithélium de l'intestin grêle est doté d'une très grande perméabilité passive aux sels et à l'eau, en raison de la perméabilité des jonctions qui unissent les cellules épithéliales. L'équilibre osmotique entre le plasma et la lumière intestinale est donc obtenu assez rapidement afin d'éviter des différences marquées de concentration ionique. Les jonctions intercellulaires sont plus perméables aux cations qu'aux anions, de sorte que les différences de concentration de Na⁺ et de K⁺ entre le sang et la lumière sont généralement plus petites que celles du Cl⁻ et du HCO₃⁻.

Des aquaporines permettent un transport passif d'eau (Agre *et al.*, 1993). Plusieurs isoformes ont été caractérisées dans l'intestin : AQP1, 3, 4, 7, 8, 9 et 10 (Koyama *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 1999). AQP1 est localisée dans la membrane des cellules constituant l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, AQP4 dans la membrane baso-latérale des cellules des cryptes et AQP8 dans la membrane apicale des entérocytes (Elkjaer *et al.*, 2001). Ces aquaporines sont des canaux hydriques stricts. Par contre, AQP3, AQP7, AQP9 et AQP10 sont également perméables à l'urée et au glycérol (Ishibashi *et al.*, 2002). Ce sont des aquaglycéroporines. AQP3 est localisée dans la membrane baso-latérale des cellules absorbantes de l'épithélium (Ramirez-Lorca *et al.*, 1999), AQP9 dans la membrane baso-latérale des cellules à mucus (Okada *et al.*, 2003) et AQP10 est exprimée dans les entérocytes du sommet des villosités (Hatakeyama *et al.*, 2001).

2.3.1.2. Absorption active de l'eau et des électrolytes

Dans l'intestin grêle, l'absorption active de l'eau et des électrolytes est soit dépendante, soit indépendante des nutriments.

2.3.1.2.1. Absorption dépendante des nutriments

L'absorption du glucose et des acides aminés neutres dépend du sodium, c'est-à-dire que chaque molécule de glucose ou d'acide aminé traverse la bordure en brosse accompagnée de sodium. La pompe à sodium (ATPase Na^+ / K^+), située exclusivement dans la membrane baso-latérale de l'entérocyte, extrait le Na^+ qui a pénétré dans la cellule à partir de la lumière afin de maintenir dans la cellule une faible concentration en Na^+ , une forte concentration en K^+ et un potentiel électrique négatif. Cette pompe procure l'énergie potentielle pour l'absorption en amont du sucre et des acides aminés. Pour chaque molécule de glucose absorbée par le cotransporteur sodium-glucose SGLT1, 2 molécules de sodium et 225 molécules d'eau sont ainsi transportées.

2.3.1.2.2. Absorption indépendante des nutriments

La plupart des mécanismes impliqués dans l'absorption active de l'eau et des électrolytes indépendante des nutriments mettent en jeu l'ATPase Na^+ / K^+ baso-latérale. Ces mécanismes sont des échangeurs Na^+ / H^+ (NHE) et $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ situés dans la membrane apicale des entérocytes (Ainsworth *et al.*, 1998). Une isoforme de NHE, NHE1, est localisée dans la membrane baso-latérale et régule le pH intracellulaire, tandis que NHE2 et NHE3 permettent l'absorption de sodium au pôle apical.

2.3.1.3. Sécrétion active des électrolytes

L'entrée du chlore au pôle baso-latéral des entérocytes est jumelée à celle du sodium et du potassium par un cotransporteur triple (NaK2Cl) avec une stoechiométrie de 1 Na⁺, 1 K⁺ et 2 Cl⁻. Le sodium est sécrété au pôle baso-latéral par la pompe Na⁺ / K⁺. Le potassium entré par NaK2Cl et par la pompe Na⁺ / K⁺ est libéré au pôle baso-latéral par les canaux potassiques. Le chlore enfin, est sécrété dans la lumière intestinale ou au pôle baso-latéral par NaK2Cl ou par les canaux chlorures. La sécrétion du Cl⁻ dans la lumière produit une différence de potentiel électrique positive vers la séreuse, ce qui assure une force de conduction nécessaire à la sécrétion du sodium par voie paracellulaire (Diamond, 1982).

2.3.2. Absorption des vitamines et des sels minéraux

Les vitamines hydrosolubles B1, B12, folate et C sont absorbées *via* des transporteurs lorsque leur concentration dans la lumière est faible, et par simple diffusion à des concentrations plus importantes (Basu & Donaldson, 2003). Les vitamines liposolubles A, D, E et K sont dissoutes dans les phases lipidiques du chyme alimentaire, puis dans les micelles qui fusionnent avec les membranes phospholipidiques des entérocytes, permettant ainsi la diffusion de leur contenu dans les cellules.

Il existe un transporteur intestinal d'ions, DCT1, qui permet le passage de nombreux ions dont Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, et Pb²⁺ (Gunshin *et al.*, 1997). Ce transporteur est couplé à une pompe à protons et est dépendant du potentiel de membrane des cellules. Le calcium est absorbé par un transport actif transcellulaire et par un transport passif paracellulaire (Bronner, 1998).

2.3.3. Absorption des glucides

Les oligosaccharides sont hydrolysés au niveau de la bordure en brosse des entérocytes par des saccharases, des maltases et des lactases sécrétées par les cellules (Eckert *et al.*, 1978) (**figure 11**). La lactase est exprimée dans la bordure en brosse des entérocytes dès la naissance chez les mammifères. Son expression diminue ensuite, tandis que celle d'enzymes faiblement exprimées pendant les premières semaines de la vie, telles que la sucrase-isomaltase, augmente (Wang *et al.*, 1998). Ces changements coïncident avec le sevrage.

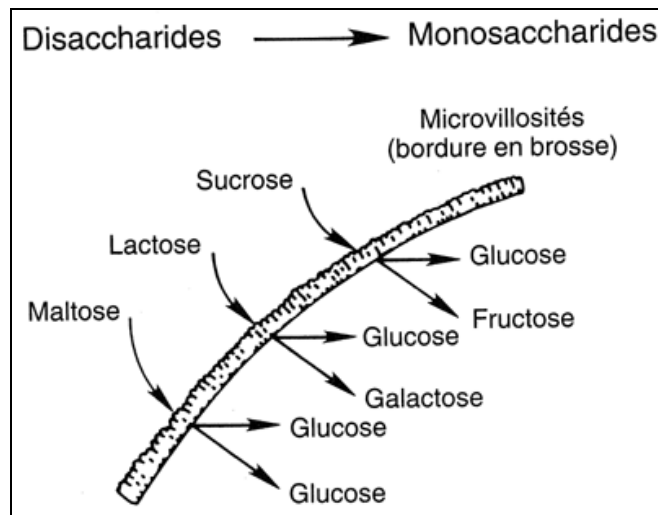


Figure 11. Hydrolyse des disaccharides en monosaccharides (extrait de *Principes fondamentaux de gastro-entérologie*).

Le glucose, produit majeur de ces digestions est absorbé par diffusion facilitée et par transport actif. La diffusion dépend de la concentration en glucose et intervient quand la concentration en glucose dans la lumière intestinale est supérieure à celle dans le plasma sanguin. Le transport actif, dominant lorsque la concentration de glucose dans la lumière intestinale est faible, met en jeu un processus de cotransport avec le sodium. Le transporteur impliqué est SGLT1 (Ferraris, 2001). Le sodium facilite la captation du glucose en se liant avec ce dernier au transporteur. Afin d'assurer une concentration intracellulaire de sodium faible, l'ion Na^+ est ensuite chassé à l'extérieur de la cellule au niveau de la membrane baso-latérale par l'ATPase Na^+ / K^+ , processus actif qui utilise l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP. Le gradient électrochimique ainsi généré par le sodium fournit l'énergie permettant l'entrée du glucose. Ce transporteur arrive à saturation pour des concentrations lumineales de glucose de 30-50mM (Debnam & Levin, 1975). A des concentrations supérieures, le glucose serait absorbé par le transporteur GLUT2, recruté du pôle baso-latéral au pôle apical des cellules (Helliwell *et al.*, 2000a et 2000b ; Kellett & Helliwell, 2000 ; Au *et al.*, 2002). La délocalisation de GLUT2 est en partie contrôlée par l'activation d'une protéine kinase C elle-même dépendante de SGLT1 (Helliwell *et al.*, 2000a et 2000b ; Kellett & Helliwell, 2000). GLUT2 possède un K_m élevé pour le glucose (15-20mM ; Craik *et al.*, 1979) et devrait donc permettre une absorption passive massive de glucose à des concentrations lumineales élevées (Kellett, 2001). Les mécanismes de l'absorption intestinale de glucose en fonction de la concentration de glucose dans la lumière sont schématisés ci-dessous (**figure 12**).

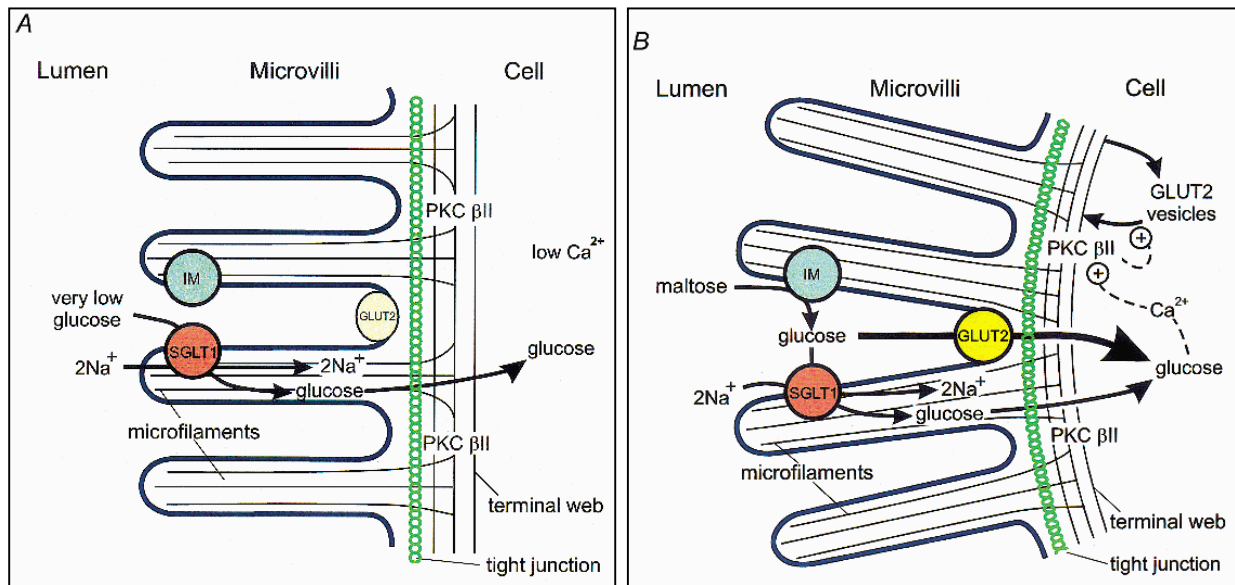


Figure 12. Modèle de régulation de l'absorption facilitée du glucose après un repas (d'après Kellett, 2001)

Avant un repas (figure 12A), le glucose est essentiellement absorbé par SGLT1. Le niveau d'expression et l'activité de GLUT2 dans la membrane apicale sont faibles. Après un repas (figure 12B), les concentrations en glucose dans la lumière sont très élevées et le passage de glucose par SGLT1 entraîne l'activation de la protéine kinase C βII et par conséquent le recrutement de GLUT2 dans la membrane apicale. Le transport de glucose par SGLT1 induit également la contraction du réseau d'acto-myosine au niveau des jonctions serrées. Ceci entraîne un changement de conformation de la cellule avantageux et devrait, en outre, permettre le passage paracellulaire de glucose.

Dans l'entérocyte, le glucose est transporté au pôle baso-latéral soit directement, soit à l'intérieur de vésicules du réticulum endoplasmique (Stümpel *et al.*, 2001 ; Santer *et al.*, 2003). Selon le modèle du transport vésiculaire, le glucose est phosphorylé en glucose-6 phosphate avant d'entrer dans le réticulum endoplasmique où il est hydrolysé par la Glc6Pase en glucose et phosphate. Il est alors libéré dans le cytosol et diffuse hors de la cellule *via* GLUT2 ou passe dans la circulation générale après fusion de la membrane microsomale avec la membrane cellulaire (figure 13).

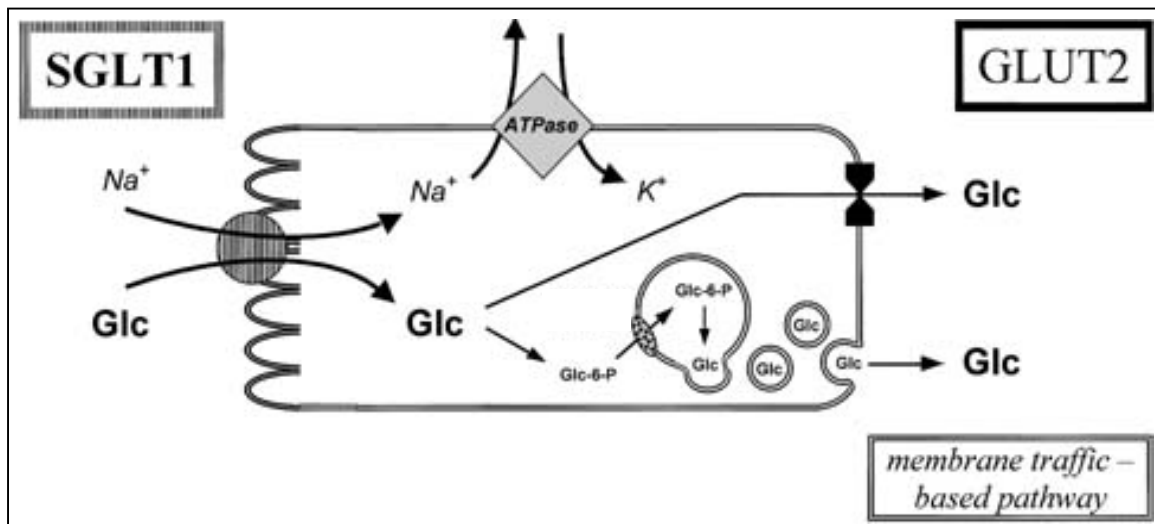


Figure 13. Modèle de transport du glucose dans l'entérocyte (d'après Santer *et al.*, 2003)

Un second transporteur d'hexoses localisé dans la membrane luminale des entérocytes est GLUT5 (Ferraris, 2001). Ce transporteur est spécifique du fructose et fonctionne par diffusion facilitée. Dans l'entérocyte, les sucres absorbés s'accumulent à une concentration supérieure à leur concentration dans l'espace extracellulaire. Ils sont évacués de la cellule à son pôle basolatéral par un processus de diffusion facilitée mettant en jeu GLUT2, transporteur du glucose, du fructose et du galactose (Ferraris, 2001).

2.3.4. Absorption des protéines

La digestion intraluminal des protéines se produit dans l'intestin grêle sous l'action séquentielle des endopeptidases et des exopeptidases pancréatiques (Eckert *et al.*, 1978). Les peptidases de la bordure en brosse hydrolysent ensuite les oligopeptides résiduels en dipeptides et en acides aminés qui sont transportés dans les cellules intestinales.

Plusieurs mécanismes impliqués dans le transport des acides aminés ont été caractérisés en fonction du type d'ion dont ils sont dépendants (sodium ou chlore) et de la nature des acides aminés qu'ils transportent (Munck, 1995 ; Palacin *et al.*, 1998). Les principaux transporteurs d'acides aminés localisés dans la bordure en brosse des entérocytes sont le transporteur d'acides aminés neutres sodium-dépendant B⁰ (Munck & Munck, 1999 ; Munck *et al.*, 2000), le transporteur d'acides aminés neutres et dibasiques sodium-dépendant B^{0,+} (Munck, 1995), le transporteur d'acides aminés anioniques sodium- et potassium-dépendant X_{AG}⁻ (Munck *et al.*, 2000), le transporteur de proline et glycine couplé à une pompe à protons PAT (Chen *et al.*, 2000),

al., 2003), le transporteur d'alanine, sérine et cystéine sodium-dépendant ASC (Munck & Munck, 1999 ; Munck *et al.*, 2000), et le transporteur d'acides aminés neutres et dibasiques sodium-indépendant $b^{0,+}$ (Munck *et al.*, 2000). Les acides aminés sont ensuite libérés dans l'espace extra-cellulaire ou dans le sang au pôle baso-latéral des entérocytes par différents transporteurs : les transporteurs sodium-dépendants A et N pour l'alanine et la glutamine (Wilde & Kilberg, 1991), y^+L pour les acides aminés dibasiques (Desjeux *et al.*, 1980), et les transporteurs sodium-indépendants asc et L pour les acides aminés neutres (Wilde & Kilberg, 1991). Certains de ces transporteurs (L, asc, $b^{0,+}$, y^+L) appartiennent à la famille des transporteurs hétéromères (HATs) récemment identifiée (Chillaron *et al.*, 2001 ; Wagner *et al.*, 2001 ; Dave *et al.*, 2004). Les HATs se distinguent des autres transporteurs d'acides aminés par leur structure en dimères constitués d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère qui confère au transporteur sa spécificité. En outre, ce sont des antiports qui permettent donc le transport simultané de deux acides aminés en sens opposé en utilisant le gradient transmembranaire généré par un transport unidirectionnel voisin ou grâce au transport de sodium (Verrey *et al.*, 2000) (**figure 14**).

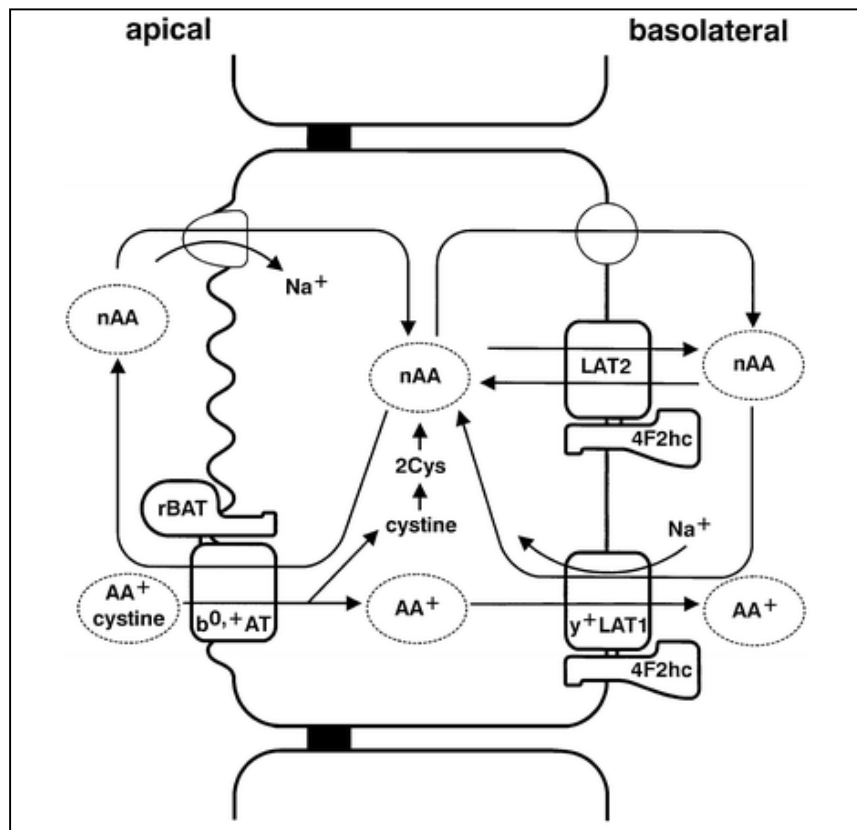


Figure 14. Modèle cellulaire de l'absorption des acides aminés par les HATs. La cystine ou un acide aminé cationique entre dans la cellule par $b^{0,+}$ (constitué de $b^{0,+}AT$ et de rBAT) qui en échange transporte un acide

aminé neutre à l'extérieur de la cellule. Cet acide aminé neutre est réabsorbé par le transporteur unidirectionnel sodium-dépendant B⁰. Un acide aminé cationique est libéré au pôle baso-latéral par y⁺L (constitué de y⁺LAT1 et 4F2hc) qui absorbe en échange un acide aminé neutre et une molécule de sodium. La cystine est clivée dans la cellule en deux résidus L-cystéines qui sont libérés au pôle baso-latéral par L (constitué de LAT2 et de 4F2hc). Les acides aminés neutres absorbés en échange peuvent ensuite être libérés au pôle baso-latéral par un transporteur unidirectionnel (**d'après Verrey *et al.*, 2000**)

Les di- et tripeptides sont transportés contre le gradient de concentration par un cotransporteur peptides / protons (PepT1) localisé dans les microvillosités des entérocytes (Ogihara *et al.*, 1996). Des auteurs ont par ailleurs suggéré l'existence d'un transporteur facilité de peptides situé au pôle baso-latéral des entérocytes qui, à l'inverse de PepT1 ne serait pas sensible au pH (Terada *et al.*, 1999 ; Shepherd *et al.*, 2002).

2.3.5. Absorption des lipides

Les lipides alimentaires sont constitués majoritairement de triglycérides, mais aussi de stérols, esters de stérols et phospholipides. Dans l'intestin grêle, **les triglycérides** sont hydrolysés par la lipase pancréatique en glycérol, en acides gras libres et en β -monoglycérides. **Les esters de cholestérol** sont hydrolysés par la cholestérol estérase pancréatique, et le cholestérol libre ainsi produit est absorbé dans les entérocytes. La phosphatidylcholine, **phospholipide** prédominant dans l'alimentation, est clivée par la phospholipase A2 pancréatique en acide gras et lysophosphatidylcholine (Van den Bosch *et al.*, 1965). Les produits de digestion des lipides forment des micelles avec les acides biliaires (Verger *et al.*, 1996). Ils traversent alors la bicouche phospholipidique constitutive de la membrane des cellules par simple diffusion en fonction de la concentration en acides gras libres dans la lumière intestinale, et / ou par transport facilité. Dans la cellule, les acides gras et le cholestérol sont réestérifiés par l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT) et incorporés dans des chylomicrons avec des triglycérides, des phospholipides et des apolipoprotéines (Buhman *et al.*, 2000). Les chylomicrons sont ensuite libérés par exocytose au pôle baso-latéral et pénètrent dans la circulation lymphatique (Tso & Balint, 1986) (**figure 15**).

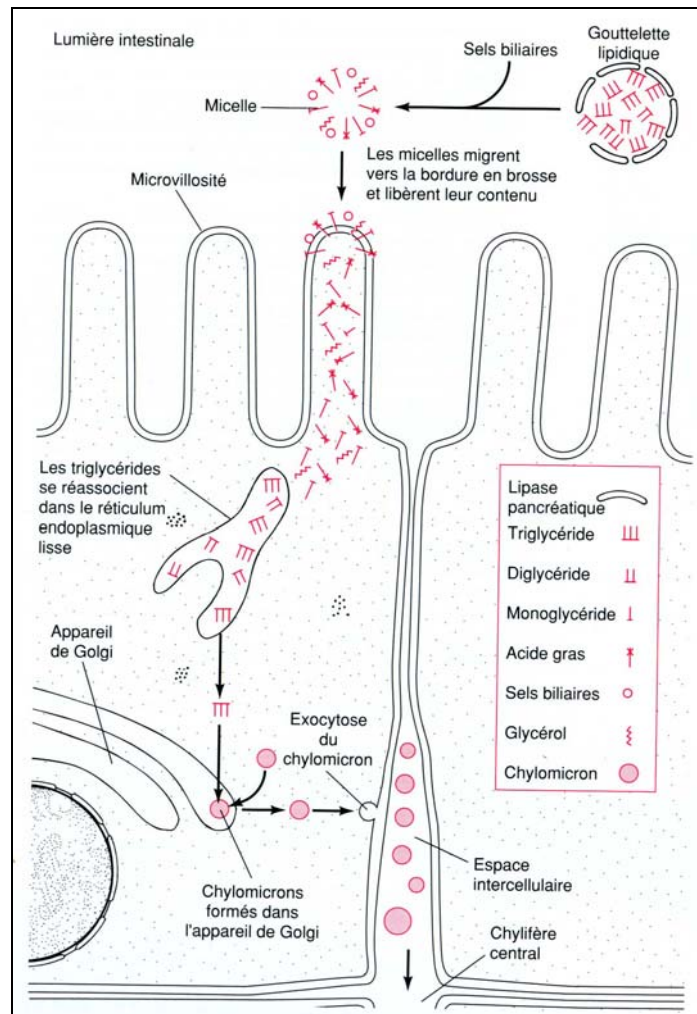


Figure 15. Modèle cellulaire de l'absorption des triglycérides (extrait de Physiologie Animale, R. Eckert, Ed. De Boeck Université)

Les transporteurs de stérols sont CD36 / FAT (Fatty Acid Translocase), SR-BI (Scavenger Receptors-BI) (Hauser *et al.*, 1998 ; Lobo *et al.*, 2001 ; Werder *et al.*, 2001) et les cavéolines (Field *et al.*, 1998). Les **cavéolines** sont des protéines associées à des caveolae, invaginations non recouvertes de clathrine à la surface de la cellule, riches en glycolipides, cholestérol et protéines impliquées dans la potocytose. Les cavéolines participent à l'absorption et au transport du cholestérol dans les cellules intestinales (Field *et al.*, 1998). **SR-BI** est localisé dans la membrane apicale des entérocytes et permet l'absorption du cholestérol contenu dans les micelles ou dans des vésicules phospholipidiques, ainsi que des esters de cholestérol, des triacylglycérols et des phospholipides (Hauser *et al.*, 1998). Il peut aussi lier des HDLs (High Density Lipoproteins) et ainsi participer au transfert du cholestérol et des esters de cholestérol

des HDLs dans la membrane cellulaire (Werder *et al.*, 2001) ou de la membrane cellulaire dans les HDLs (Ji *et al.*, 1997). Dans ce dernier cas, les HDLs délivrent ensuite leur contenu au niveau des tissus stéroïdogènes (glandes surrénales, ovaires, testicules) pour la synthèse d'hormones et du foie pour la synthèse de bile (Glomset, 1968). L'efflux de cholestérol est également réalisé au pôle apical et au pôle baso-latéral de la cellule intestinale grâce à la présence de transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) (Repa *et al.*, 2000 ; Mulligan *et al.*, 2003). **CD36** appartient à la famille des récepteurs SR-BI et peut lier des HDLs, des LDLs (Low DLs), des VLDLs (Very Low DLs) ou des phospholipides anioniques (Rigotti *et al.*, 1995 ; Calvo *et al.*, 1998). Il intervient également dans le transfert de cholestérol dans les HDLs mais avec une efficacité sept fois moindre que SR-BI (Connelly *et al.*, 1999).

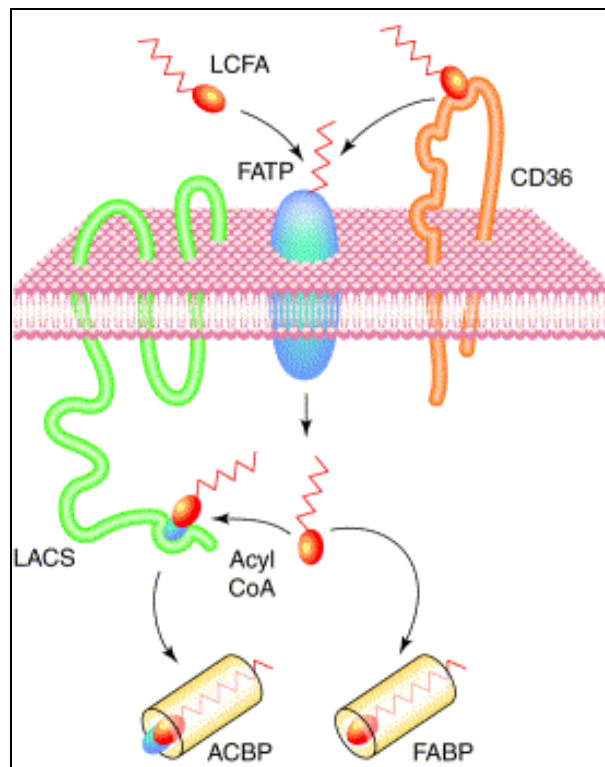


Figure 16. Modèle cellulaire de l'absorption des acides gras (d'après Stahl *et al.*, 2001)

Les protéines permettant l'absorption des acides gras par un processus de diffusion facilitée sont les FABPs (Fatty Acid Binding Proteins) (Ockner & Manning, 1974 ; Schroeder *et al.*, 1998 ; Abumrad *et al.*, 1998), les FATPs (Fatty Acid Transport Proteins) (Hirsch *et al.*, 1998 ; Stahl *et al.*, 1999 et 2001), les LACS (Long Chain Acyl-CoA Synthetase, ligase) et CD36. **CD36** permet l'absorption des acides gras présents à faible concentration dans la lumière intestinale, peut lier et concentrer un grand nombre d'acides gras à la surface de la cellule et enfin, peut transférer des acides gras à longues chaînes vers les FATPs. **FATP4** est

l'unique isoforme intestinale des FATPs (Stahl *et al.*, 1999). Elle est située au pôle apical des entérocytes et permet l'absorption des acides gras à longue chaîne. Dans la cellule, les **LACS** catalysent la réaction d'estérification des acides gras et du co-enzyme A en acyl-CoA, ce qui entraîne une diminution des acides gras libres dans la cellule et permet par conséquent une absorption d'acides gras supplémentaires dans le sens du gradient de concentration. Les **FABPs** et les **ACBPs** (Acyl-CoA Binding Proteins) jouent un rôle de tampon cytoplasmique en fixant, respectivement, les acides gras à longue chaîne et les acyl-CoA, ce qui évite leur efflux hors de la cellule et facilite leur transport cytoplasmique (**figure 16**).

2.3.6. Régulation des processus impliqués dans l'absorption intestinale

2.3.6.1. Régulation hormonale et par les neurotransmetteurs

2.3.6.1.1. Absorption (et sécrétion) de l'eau et des électrolytes

Les glucocorticoïdes stimulent l'absorption d'eau et de NaCl, induisent une augmentation des échanges Na^+ / H^+ et du niveau d'expression génique de NHE3 (Wormmeester *et al.*, 1998).

Les canaux chlorures luminaux sont fermés au repos et s'ouvrent lorsque la sécrétion est stimulée par une hormone ou par un neurotransmetteur (VIP, prostaglandines, acétylcholine, sérotonine) (Stewart & Turnberg, 1989 ; Cooke, 2000). La sécrétion est inhibée sous l'action des adrénocorticoïdes, de la noradrénaline, de la somatostatine, des enképhalines et de la dopamine (Roberts *et al.*, 1988 ; Cooke, 1998). Le système nerveux sympathique qui innerve la muqueuse intestinale en libérant de la noradrénaline inhibe la sécrétion des électrolytes et en stimule l'absorption (Cooke & Reddix, 1994).

2.3.6.1.2. Absorption des sels minéraux et des vitamines

La 1,25-dihydroxyvitamine D3, métabolite actif de la vitamine D3 est la principale hormone régulant l'absorption intestinale de calcium (Gallagher *et al.*, 1979). L'absorption de calcium augmente avec la concentration plasmatique de 1,25-dihydroxyvitamine D3. Elle augmente aussi sous l'action de la prolactine, par un mécanisme mettant en jeu l'ATPase Na^+ / K^+ dans le duodénum (Krishnamra *et al.*, 1998).

2.3.6.1.3. Absorption des glucides

Les glucocorticoïdes et la thyroxine ont une action synergique au moment du sevrage pour augmenter l'expression génique et l'activité de la sucrase-isomaltase dans les entérocytes. L'augmentation de la lactase observée chez le fœtus avant la naissance serait régulée par l'hydrocortisone (Villa *et al.*, 1992). En revanche, les hormones thyroïdiennes, mais pas les glucocorticoïdes, entraîneraient une diminution de la lactase durant la lactation (Freund *et al.*, 1991). Chez l'adulte, les glucocorticoïdes stimulent l'absorption de sucres au niveau de l'intestin normal (Batt & Peters, 1976 ; Batt & Scott, 1982 ; Iannoli *et al.*, 1998) ou inflammé (Sundaram *et al.*, 1999) ou encore après résection (Thiesen *et al.*, 2003a). Dans ce dernier cas, l'absorption de glucose et de fructose augmente sans qu'il y ait de variation ni de l'expression génique, ni de la quantité de protéine de SGLT1, GLUT5, GLUT2 ou de l'ATPase Na⁺ / K⁺. Une alimentation enrichie en acides gras saturés renforce les effets des glucocorticoïdes sur l'absorption du fructose (Thiesen *et al.*, 2003b) mais une alimentation riche en acides gras polyinsaturés prévient ces effets sur l'absorption de D-glucose (Thiesen *et al.*, 2003c). Les hormones thyroïdiennes augmentent enfin de manière dose-dépendante le niveau de l'expression du gène codant pour GLUT5 dans des cellules Caco-2 / TC7 (Matosin-Matekalo *et al.*, 1999).

Une injection de GIP ou de GLP-2 stimule l'absorption de glucose au pôle apical des entérocytes, mais n'entraîne pas d'augmentation de la quantité de protéine de GLUT2 dans la membrane baso-latérale (Cheeseman & O'Neill, 1998).

EGF entraîne également une augmentation de l'absorption intestinale de glucose en stimulant le recrutement et l'insertion de SGLT1 dans la bordure en brosse des entérocytes, par un mécanisme impliquant la polymérisation de l'actine (Chung *et al.*, 1999).

Par contre, la leptine réduit l'absorption de glucose par les entérocytes (Lostao *et al.*, 1998) et la cholécystokinine entraîne une diminution de la synthèse de SGLT1 (Hirsh & Cheeseman, 1998).

IL-1 β réduirait également l'absorption intestinale de glucose en inhibant l'ATPase Na⁺ / K⁺ dans la membrane baso-latérale des entérocytes (Kreydiyyeh *et al.*, 1998), tandis que IL-1 α , IL-6 et IL-8 stimulent l'absorption de glucose *in vitro* (Hardin *et al.*, 2000).

2.3.6.1.4. Absorption des acides aminés et des peptides

Les glucocorticoïdes stimulent l'absorption de la leucine, de la glutamine, de l'alanine et de l'arginine (Iannoli, 1998).

La leptine produite par l'estomac entraîne une augmentation de la quantité de protéine PepT1 dans la bordure en brosse des entérocytes et donc une absorption accrue de peptides

(Buyse *et al.*, 2001). La leptine stomacale préviendrait l'absorption intestinale de lipides en stimulant celle des protéines et pourrait ainsi contribuer à une diminution du stockage de lipides (Morton *et al.*, 1998).

L'insuline stimule également l'absorption intestinale de peptides en activant le recrutement de la protéine PepT1 dans la bordure en brosse à partir de son lieu de stockage cytoplasmique (Thamotharan *et al.*, 1999a).

Par contre, le VIP inhibe l'absorption intestinale d'alanine (Barada *et al.*, 1998).

L'hormone thyroïdienne T3 entraîne une diminution de l'expression génique et de la synthèse protéique de PepT1 chez l'adulte et serait également impliquée dans le déclin de PepT1 chez le jeune au moment du sevrage (Ashida *et al.*, 2001).

2.3.6.1.5. Absorption des acides gras et des stérols

Une administration orale de stéroïdes à de jeunes rats au moment du sevrage stimule l'absorption intestinale de lipides (Thiesen *et al.*, 2003d). L'effet des stéroïdes dépend de la nature des lipides contenus dans l'alimentation : il est renforcé par une alimentation riche en acides gras saturés et atténué par une alimentation enrichie en acides gras polyinsaturés. Chez l'adulte, la prise orale de glucocorticoïdes stimule également l'absorption de certains lipides dont les acides oléique et linoléique (Thiesen *et al.*, 2002).

Des récepteurs aux hormones nucléaires régulent l'absorption des stérols alimentaires en modulant la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol (Chen, 2001). L'activation de ces récepteurs par la fixation d'oxystérols ou d'acides biliaires stimule par exemple la transcription du gène codant pour un transporteur ABC ou inhibe celle du gène codant pour l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase. Ces deux mécanismes de régulation auront pour conséquence une réduction de la quantité de cholestérol absorbée.

2.3.6.2. Régulation par les nutriments

2.3.6.2.1. Absorption des sels minéraux et des vitamines

L'absorption intestinale des sels minéraux et des vitamines diminue généralement avec l'augmentation de la quantité de ces micronutriments dans l'alimentation (Ferraris & Diamond 1989).

Le transporteur d'électrolytes DCT1 est surexprimé dans le cas d'une alimentation pauvre en sels minéraux (Gunshin *et al.*, 1997). Le transport de calcium est stimulé lors d'une alimentation pauvre en calcium (Auchere *et al.*, 1998) ou riche en fructo-oligosaccharides

(carbohydrates de faible masse moléculaire non digestibles) tels que l'inuline, la gomme de guar, ou la cellulose (Morohashi *et al.*, 1998).

2.3.6.2.2. Absorption des glucides

Une alimentation riche en sucrose et en particulier en fructose entraîne, 3h après leur ingestion, une augmentation de l'expression génique de la sucrase-isomaltase et de la lactase-phlorizine hydrolase dans l'intestin grêle (Goda, 2000). L'activation de la transcription de ces deux gènes se ferait *via* la fixation de Cdx2 sur leurs promoteurs (Goda, 2000). Le fructose stimule également l'activité de la sucrase-isomaltase et augmente les synthèses d'ARNm de SGLT1 et GLUT5 (Kishi *et al.*, 1999 ; Goda, 2000). Le glucose stimule les synthèses de l'ARNm et de la protéine de SGLT1 *in vivo* (Miyamoto *et al.*, 1993 ; Burant & Saxena, 1994) et augmente de manière dose-dépendante le niveau de l'expression du gène codant pour GLUT5 dans des cellules Caco-2 / TC7 (Matosin-Matekalo *et al.*, 1999). Enfin, une alimentation enrichie en fructose ou en galactose stimulerait la transcription du gène codant pour GLUT2 (Miyamoto *et al.*, 1993), tandis qu'une alimentation enrichie en fructose ou en glucose entraîne une augmentation de la quantité de protéine de GLUT2 dans la membrane baso-latérale des entérocytes (Burant & Saxena, 1994).

Par ailleurs, l'absorption de glucose *via* SGLT1 est stimulée par la présence de polyamines dans la lumière intestinale (Uda *et al.*, 2002).

2.3.6.2.3. Absorption des acides aminés et des peptides

Au moment du sevrage, le passage d'une alimentation lactée riche en protéines à une alimentation contenant davantage de carbohydrates que de protéines entraînerait une diminution de PepT1 (Shen *et al.*, 2001). Chez l'adulte, une alimentation riche en protéines stimule l'absorption des acides aminés et des peptides dans les régions distales de l'intestin grêle (Erickson *et al.*, 1995) en activant la transcription du gène codant pour PepT1. Shiraga *et al.* (1999) ont en effet montré l'existence d'un élément de réponse aux acides aminés et aux dipeptides situé dans la région promotrice du gène de PepT1. Enfin, la pré-incubation de cellules Caco-2 avec des dipeptides neutres, mono- ou dicationique entraîne une augmentation de l'influx de L-Arg dans les cellules *via* le transporteur b^{0,+} (Wenzel *et al.*, 2001).

Une alimentation pauvre en protéines s'accompagne d'un transport accru des acides aminés essentiels mais pas de ceux non essentiels (Ferraris & Diamond, 1989).

2.3.6.2.4. Absorption des acides gras et des stérols

L'absorption intestinale d'acides décanoïque, dodécanoïque, palmitique, stéarique, linoléique, de cholestérol et d'acides biliaires primaires (acides chénodésoxycholique et taurochénodésoxycholique) est augmentée dans le cas d'un régime alimentaire enrichi en acides gras saturés par rapport à un régime isocalorique riche en acides gras polyinsaturés (Thomson *et al.*, 1986). Par ailleurs, une alimentation riche en acides gras à longue chaîne augmente le niveau de l'expression du gène codant pour FABP et FAT / CD36 (Ockner & Manning, 1974 ; Mallordy *et al.*, 1995 ; Poirier *et al.*, 1996 et 1997). Cependant, l'absence du gène codant pour CD36 n'affecte pas l'absorption intestinale de lipides (Goudriaan *et al.*, 2002).

L'absorption de glucose et de galactose *via* SGLT1 stimule l'absorption de cholestérol par SR-BI au pôle apical des entérocytes et sa sécrétion au pôle baso-latéral (Play *et al.*, 2003). Par contre, des HDLs, des apolipoprotéines plasmatiques et de manière plus générale, des peptides possédant une structure en hélice α amphipathique composée d'au moins 18 acides aminés, inhibent de manière compétitive l'absorption des stérols en se fixant sur SR-BI (Boffelli *et al.*, 1997 ; Schulthess *et al.*, 2000).

2.4. Néoglucogenèse intestinale

La PEPCK et la Glc6Pase sont exprimées dans l'intestin grêle qui produit donc du glucose par la voie de la néoglucogenèse (Anderson & Rosendall, 1973 ; Rajas *et al.*, 1999 et 2000 ; Mithieux, 2001). Les principaux précurseurs de la néoglucogenèse dans l'intestin sont le glycérol et surtout la glutamine (Croset *et al.*, 2001).

Dans l'intestin grêle comme dans le foie de rats ayant un diabète induit par streptozotocine, le niveau de l'expression génique de la Glc6Pase est normalisé après une injection d'insuline. Par contre, l'activité de la Glc6Pase reste élevée dans le duodénum, ainsi que dans le foie et le rein, et diminue uniquement dans le jéjunum (Rajas *et al.*, 1999). Le niveau de l'expression génique de la PEPCK diminue également, mais reste toutefois plus élevé que chez les animaux contrôles (Rajas *et al.*, 2000). Enfin, l'activité de la PEPCK est normalisée dans le jéjunum mais pas dans le duodénum.

Les facteurs de transcription intestinaux Cdx1 et Cdx2 participent au contrôle de l'expression du gène de la Glc6Pase dans l'intestin en se fixant sur le promoteur de ce gène

(Gautier-Stein *et al.*, 2003). Cependant, seul Cdx1 stimule la transcription du gène de la Glc6Pase. Cdx2 inhibe l'effet de Cdx1 ou seul, est sans effet.

3. Effets du jeûne et de la réalimentation sur l'intestin grêle

3.1. Le jeûne

3.1.1. Effets sur la morphologie intestinale

Au cours du jeûne, les mécanismes cellulaires au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle sont transitoirement interrompus (Goodlad *et al.*, 1988). Les mitoses sont en effet bloquées dans les cryptes de Lieberkühn (zones de prolifération cellulaire) et le taux de migration des cellules indifférenciées vers les zones fonctionnelles absorbantes que forment les villosités, est réduit (Brown *et al.*, 1963). Par ailleurs, la plupart des travaux décrivent une augmentation du nombre de cellules en apoptose et de l'exfoliation des cellules dans la lumière intestinale après seulement un à trois jours de jeûne (Elmes, 1977 ; Boza *et al.*, 1999 ; Iwakiri *et al.*, 2001 ; Clarke 1975). Une étude montre cependant un arrêt des phénomènes apoptotiques après 3 jours de jeûne chez le rat (Luciano *et al.*, 1995). Les modifications de l'activité cellulaire se traduisent au plan tissulaire par une importante résorption de l'épithélium intestinal au cours du jeûne (Altmann, 1972). Les observations en microscopie optique et en microscopie électronique à balayage montrent un raccourcissement des villosités intestinales, la destruction de certains sommets de villosités ainsi que des fissures au niveau de leurs bases (Altmann, 1972 ; Dunel-Erb *et al.*, 2001). Ces phénomènes entraînent une réduction de moitié de la masse de la muqueuse intestinale chez des rats après 5 jours de jeûne (Dunel-Erb *et al.*, 2001).

Les études concernant les effets du jeûne sur la bordure en brosse donnent des résultats contradictoires. La hauteur des microvillosités diminue chez des hamsters à jeun (Misch *et al.*, 1980). Par contre, la hauteur et le nombre de microvillosités par surface augmentent (Gupta & Waheed, 1992 ; Waheed & Gupta, 1997) ou ne sont pas affectés au cours du jeûne chez le rat (Mayhew, 1990).

3.1.2. Effets sur la fonction intestinale

Le jeûne entraîne d'importantes modifications de l'absorption intestinale spécifiques ou non de la nature du transport considéré.

3.1.2.1. Modifications non spécifiques

La synthèse protéique est diminuée dans l'intestin grêle après cinq jours de jeûne (Samuels *et al.*, 1996).

La perméabilité de l'intestin grêle augmente au cours du jeûne, ce qui entraîne le passage d'ions, d'eau, mais également de macromolécules (>40 kDa) à travers l'épithélium par voie paracellulaire (Welsh *et al.*, 1998).

Le transport transcellulaire peut être affecté directement par une diminution de la surface de la muqueuse intestinale au cours du jeûne (Diamond *et al.*, 1984) et par des changements de la composition de la bicouche phospholipidique des entérocytes. Le jeûne entraîne en effet une diminution des ratios de cholestérol / phospholipides, sphingomyéline / phosphatidylcholine, protéines / lipides, une réduction de la composition en acides oléiques et linoléiques, et une augmentation des phospholipides totaux de la bordure en brosse, du degré d'insaturation des acides gras, ainsi que du pourcentage en acides stéariques et arachidoniques (Waheed *et al.*, 1998). Ces changements altèrent les propriétés physico-chimiques de la bordure en brosse et modifient par conséquent ses fonctions de transport. Un autre mécanisme pouvant influencer l'absorption intestinale de manière non spécifique au cours du jeûne est l'augmentation du ratio des cellules matures absorbantes par rapport aux cellules immatures (Ferraris & Diamond, 1997). La combinaison de ces mécanismes pourrait expliquer une augmentation du taux d'absorption par unité de masse intestinale (Ferraris & Carey, 2000).

3.1.2.2. Le transport des ions et de l'eau

Un jeûne de 48 à 72h entraîne une augmentation du transport transcellulaire d'ions et de la perméabilité entre les cellules jointives de l'épithélium intestinal (Young & Levin, 1990a et b; Carey *et al.*, 1994). Le flux sécrétoire net de chlore et éventuellement d'ions bicarbonate est ainsi accru dans le jéjunum et l'iléum. La sécrétion d'anions crée un gradient électrique qui entraîne un transport passif de sodium dans la lumière intestinale par voie paracellulaire. La présence des deux types d'ions dans la lumière génère une force osmotique

permettant la sécrétion d'eau. L'intestin perd ainsi une importante quantité d'eau et d'ions. Cette hypersécrétion au cours du jeûne est encore renforcée par une réponse accrue de l'intestin grêle aux agents sécrétagogues (AMPc, GMPc) (Young & Levin, 1990a et b; Carey *et al.*, 1994).

Bien qu'une hypersécrétion soit le phénomène le plus couramment observé, le jeûne peut entraîner une augmentation de l'absorption intestinale d'ions *in vitro*, notamment lorsque des nutriments dont l'absorption est couplée à celle du sodium comme le D-glucose sont ajoutés dans le milieu (Young & Levin, 1990b; Carey *et al.*, 1994).

Le jeûne entraîne enfin une diminution de l'activité de la pompe Na^+ / K^+ au pôle baso-latéral des entérocytes (Murray & Wild, 1980).

Mécanismes impliqués :

Des injections de glucagon entraînent chez l'animal nourri une augmentation de la sécrétion de chlore (Lane *et al.*, 1992). Cette hormone augmente au début du jeûne (Marliss *et al.*, 1970) et pourrait alors être à l'origine d'une hypersécrétion intestinale (Levin, 1992).

Par ailleurs, l'augmentation du transport d'ions au cours du jeûne est induite par des altérations de l'activité du système nerveux entérique (Nzegwu & Levin, 1994 ; Hayden & Carey, 2000).

Le jeûne cause enfin un stress oxydatif incluant des changements de l'expression des enzymes anti-oxydantes et la production de radicaux libres par les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale (Darmon *et al.*, 1993 ; Welsh *et al.*, 1998). Ce stress oxydatif stimule la sécrétion de chlore et accroît la perméabilité de l'épithélium intestinal (Grisham *et al.*, 1990 ; Darmon *et al.*, 1993)

3.1.2.3. Le transport des vitamines et des sels minéraux

Les différentes études concernant les effets du jeûne sur l'absorption intestinale des vitamines et des sels minéraux ne suggèrent pas une tendance générale. L'absorption de folate *in vivo* n'est pas affectée par un jeûne nocturne chez le chien (Hakim *et al.*, 1992). Au contraire, l'absorption de calcium *in vitro* augmente chez des rats dénutris (Chadha *et al.*, 1992).

3.1.2.4. L'absorption des oligosaccharides

Une réduction de l'activité des saccharidases (maltases et saccharases) de la bordure en brosse a été observée au cours du jeûne (Ihara *et al.*, 2000a). La lactase augmente pendant les premiers jours du jeûne puis diminue également (Raul *et al.*, 1982).

L'absorption intestinale de glucose augmente chez des rats après 72h de jeûne (Das *et al.*, 2001). Cette augmentation pourrait être corrélée à la baisse de la concentration intracellulaire de sodium (Young & Levin, 1990a et b; Carey *et al.*, 1994), à l'accroissement de la surface de la bordure en brosse (Gupta & Waheed, 1992 ; Waheed & Gupta, 1997) et de la fluidité de la membrane cellulaire (Gupta & Waheed, 1992), ou encore à des changements de l'expression de transporteurs. Le niveau de l'expression génique de SGLT1 augmente au cours du jeûne selon Gal-Garber *et al.* (2000). Ceci est cohérent avec la diminution de la concentration intracellulaire de sodium qui génère la force osmotique nécessaire au cotransport de sodium et de glucose dans la cellule. Ce résultat n'est cependant pas confirmé par Ihara *et al.* (2000b) qui n'observent pas de variation significative de la quantité d'ARNm de SGLT1 au cours du jeûne.

Les effets du jeûne sur l'expression de GLUT5 et GLUT2 sont peu connus. Une restriction calorique chronique entraîne une augmentation de l'absorption de fructose par mg d'intestin *via* GLUT5 (Casirola *et al.*, 1996). Par contre, le transport baso-latéral d'hexoses *via* GLUT2 n'est pas affecté par une restriction calorique (Marciani *et al.*, 1987).

Mécanismes impliqués :

Une perfusion de glucagon chez l'animal nourri entraîne une augmentation de l'absorption intestinale de glucose (Debnam & Sharp, 1993). L'augmentation de la concentration plasmatique de glucagon au cours du jeûne (Marliss *et al.*, 1970) pourrait expliquer l'augmentation de l'absorption de glucose.

A notre connaissance, aucune étude ne traite à ce jour d'une régulation nerveuse des effets du jeûne sur l'absorption des sucres. Cependant, la lésion chimique des afférences vagales chez l'animal nourri supprime les changements de l'absorption de glucose induits par une alimentation enrichie en carbohydrates (Bates *et al.*, 1998). Ce résultat suggère l'existence d'une régulation nerveuse intervenant lors de modifications de l'état nutritionnel.

Le niveau de l'expression génique de SGLT1 semble être sous l'influence du rythme circadien (Rhoads *et al.*, 1998). La quantité d'ARNm de SGLT1 est particulièrement élevée

au début de la nuit chez des rats et en début de matinée chez des singes diurnes, ce qui coïncide dans les deux cas avec le début de leur prise alimentaire.

3.1.2.5. Le transport des acides aminés

Un jeûne de 2 jours entraîne une diminution de l'activité de la glutaminase mais n'affecte pas la distribution de l'ARNm de cette enzyme (Kong *et al.*, 2000). Les auteurs suggèrent que l'accumulation de l'ARNm de la glutaminase pendant le jeûne constituerait une préparation anticipée de l'intestin à l'absorption dès restauration de l'alimentation. Des études ont par ailleurs montré une augmentation de l'activité des peptidases après 5 jours de jeûne (Ihara *et al.*, 2000a) et une augmentation du taux d'ARNm et de la quantité de protéines du transporteur PepT1 (Ogihara *et al.*, 1999 ; Thamocharan *et al.*, 1999b ; Ihara *et al.*, 2000b). Pendant un jeûne enfin, le transport d'acides aminés par un mécanisme dépendant (proline, glycine, acide glutamique) ou indépendant (lysine) du sodium augmente (Waheed et Gupta, 1997). Ces résultats pourraient corroborer l'hypothèse de Kong *et al.* (2000) indiquée ci-dessus.

3.1.2.6. L'absorption des lipides

L'expression des FABPs impliquées dans le transport des acides gras augmente pendant le jeûne (Besnard *et al.*, 1991).

3.1.2.7. La néoglucogenèse

L'expression génique et l'activité de la PEPCK et de la Glc6Pase augmentent dans l'intestin grêle chez des rats soumis à un jeûne de 48h, puis atteignent une valeur plateau à 72h de jeûne (Rajas *et al.*, 1999 ; Rajas *et al.*, 2000 ; Mithieux *et al.*, 2004). A 72h de jeûne, la production de glucose par l'intestin grêle représente 35% de la production endogène totale de glucose (Mithieux *et al.*, 2004).

3.2. La réalimentation

3.2.1. Restauration morphologique

Après réalimentation, la morphologie de l'épithélium intestinal est rapidement restaurée. Cette régénération cellulaire et tissulaire est partielle après un jour (Altmann, 1972 ; Blikslager & Roberts, 1997), et complète après trois jours de réalimentation (Boza *et al.*, 1999 ; Dunel-Erb *et al.*, 2001). La régénération de la muqueuse intestinale est liée à une reprise quasi instantanée des mitoses dans les cryptes de Lieberkühn après quelques heures de réalimentation (Cameron et Cleffmann, 1964 ; Altmann, 1972). Les nouvelles cellules migrent ensuite le long de la membrane basale vers les villosités où elles se différencient en entérocytes. Ces mécanismes cellulaires permettent la restauration de la surface absorbante de l'intestin grêle.

Il semble que ce soit l'absorption entérale des nutriments qui stimule la régénération morphologique des villosités intestinales, et non pas la présence des nutriments dans la lumière intestinale, ni la réalimentation parentérale (Tarachai & Yamauchi, 2000). Par ailleurs, la composition de la nourriture semble intervenir dans la reprise de l'activité cellulaire lors de la réalimentation. Cameron et Cleffmann (1964) ont observé que la synthèse d'ADN n'augmente pas chez des animaux nourris avec de la gélatine et du sucrose, et suggèrent qu'il faut un apport nutritionnel complet pour stimuler la prolifération cellulaire après un jeûne de 3 jours. Rampal (1993) a par ailleurs suggéré que certains acides aminés, dont la glutamine, constitueraient une source énergétique indispensable pour le métabolisme de l'entérocyte. Il a observé qu'une carence protéique entraîne une réduction de la vitesse de migration des cellules des cryptes vers les villosités, bien que l'index mitotique mesuré dans les cryptes soit normal. Parallèlement, une alimentation enrichie en peptides et en glutamine est sans effet sur la prolifération cellulaire dans les cryptes de Lieberkühn (Mandir et Goodlad, 1999), mais stimule la migration des cellules et probablement leur différenciation en entérocytes. Botsios *et al.* (1993) ont également montré qu'après 3 jours de jeûne, une réalimentation enrichie en peptides est rapidement absorbée et permet de préserver la bordure en brosse des cellules. Par contre, Buts *et al.* (1990) ont montré que les lipides stimulent la régénération de la muqueuse après 4 jours de jeûne. Ils ont en effet mesuré des villosités intestinales plus longues chez des animaux réalimentés avec une nourriture enrichie en lipides.

3.2.2. Restauration fonctionnelle

La synthèse et l'expression des enzymes intestinales et des transporteurs impliqués dans l'absorption des nutriments semblent également varier en fonction de la composition nutritionnelle de la réalimentation. Les activités de l'aminopeptidase et de la saccharase intestinales sont ainsi stimulées par leurs substrats respectifs (protéines et oligosaccharides) (Raul & Schleiffer, 1996), tandis qu'une réalimentation enrichie en lipides provoque une diminution de l'activité des sucrases (Goda & Takase, 1994).

Une réalimentation de 48h après un jeûne de 4 jours chez le poulet stimule la synthèse de l'ARNm de SGLT1 (Gal-Garber *et al.*, 2000).

Une ingestion de lipides après 12h de jeûne entraîne une délocalisation de SR-BI. Le transporteur, qui est principalement localisé dans la membrane apicale chez les animaux à jeun, pénètre dans le cytoplasme par endocytose au cours de l'absorption de lipides et s'accumule au niveau de gouttelettes lipidiques (Hansen *et al.*, 2003).

Les niveaux d'expression génique de la PEPCK et de la Glc6Pase sont normalisés après 7h de réalimentation chez des animaux ayant préalablement subi un jeûne de 48h (Rajas *et al.*, 1999 ; Rajas *et al.*, 2000).

Les effets de réalimentations de compositions nutritionnelles différentes sur la synthèse et l'expression des autres transporteurs cependant ne sont pas encore très bien connus. En outre, tous ces résultats ont été obtenus lors de réalimentations après des jeûnes courts correspondants à la phase II (phase d'utilisation des réserves lipidiques). Les effets de la réalimentation après la phase de jeûne caractérisée par l'utilisation des protéines pour satisfaire les besoins énergétiques (phase III) sont par contre très peu connus.

Problématique et approche expérimentale

1. Problématique et objectifs

L'objectif de ces travaux de thèse était de comprendre les mécanismes permettant l'absorption intestinale optimale des nutriments après un jeûne, en particulier lorsque l'animal atteint une phase critique d'utilisation de ses réserves énergétiques se traduisant par un catabolisme protéique important et une synthèse protéique diminuée.

Les données bibliographiques témoignent de l'importance des altérations induites par le jeûne sur la morphologie de l'intestin grêle et sur la fonction intestinale (**cf. Revue Bibliographique 3.1.**). Le nombre de cellules fonctionnelles absorbantes diminue et la synthèse protéique est réduite. Cependant, les études des effets du jeûne sur l'absorption intestinale suggèrent généralement une augmentation de l'absorption chez les animaux à jeun. Cette augmentation pourrait s'expliquer par l'accroissement de la perméabilité intestinale et / ou du ratio des cellules matures absorbantes par rapport aux cellules immatures. Les effets du jeûne sur les transports spécifiques des nutriments sont encore largement méconnus. Des études montrant une augmentation du niveau de l'expression génique et / ou de la quantité de protéines de certains transporteurs n'ont pas été confirmées.

Par ailleurs, les effets du jeûne sur la structure et la fonction intestinales ont toujours été étudiés sans prendre en compte l'état métabolique et hormonal des individus à jeun, alors même que le niveau de déplétion des réserves énergétiques de l'organisme est susceptible d'influencer le métabolisme de l'entérocyte et ses fonctions de transport. Ainsi, les jeûnes étudiés sont souvent des jeûnes courts présentant les caractéristiques d'une phase I, voire éventuellement d'une phase II, mais jamais d'une phase III de jeûne.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié les altérations tissulaires induites par les phases II et III du jeûne sur la muqueuse de l'intestin grêle (**Articles 1 et 2**). Malgré l'intensité des dommages causés par un jeûne de phase III sur la muqueuse intestinale, celle-ci est restaurée aussi vite après un jeûne de phase III qu'après un jeûne de phase II (Dunel-Erb *et al.*, 2001). Nous avons alors recherché les mécanismes cellulaires pouvant expliquer cette restauration particulièrement rapide, en étudiant la prolifération cellulaire dans les cryptes de Lieberkühn, la migration des cellules indifférenciées des cryptes dans les villosités et l'apoptose au sommet des villosités (**Article 2**). Afin d'approfondir nos travaux concernant les effets des phases II et III sur l'apoptose, nous avons mesuré l'expression génique et la quantité de protéine de cytokines (TNF α , TGF β 1) et d'un facteur de transcription intestinal

(Cdx2) pro-apoptotiques (**Article 3**). Dans la dernière partie de la thèse enfin, nous nous sommes intéressés aux changements des niveaux d'expression génique et des quantités de protéines des transporteurs d'hexoses, SGLT1, GLUT2 et GLUT5, et des enzymes néoglucogéniques, la PEPCK et la Glc6Pase, en fonction de l'utilisation des réserves énergétiques des animaux à jeun et donc de la nature et la disponibilité en précurseurs de la néoglucogenèse (glycérol en phase II, acides aminés en phase III) (**Article 4**).

2. Approche expérimentale

2.1. Modèle animal et traitements nutritionnels

Les expériences ont été réalisées sur des rats mâles de souche Wistar (Iffa Credo, L'Arbresle, France) âgés de 7 à 10 semaines, pesant 200-300g à la réception.

A l'issue d'une période d'acclimatation d'une semaine, un groupe de rats a été sacrifié et considéré comme groupe contrôle (Ctrl). Les autres ont été mis à jeun. Ces animaux disposaient d'eau *ad libitum*, mais n'avaient pas accès à la nourriture ou à leurs fèces. La cinétique correspondant à la perte de masse journalière spécifique dM/Mdt (g/kg/j) a été déterminée pour chaque animal (dM représente la masse perdue par l'animal pendant une durée $dt=t_1-t_0$ et M est la masse corporelle de l'animal à t_0) et a permis de caractériser trois phases distinctes de durée variable selon les individus (**cf. Revue Bibliographique 1.2.1.1**). Un groupe de rats a été sacrifié en phase II de jeûne (P2r0), et trois autres groupes en phase II ont été réalimentés pendant 2h (P2r2), 6h (P2r6), ou 24h (P2r24), puis sacrifiés. Quatre autres séries de rats ont poursuivi le jeûne jusqu'au second jour de phase III. Un groupe a été sacrifié immédiatement (P3r0) et les 3 autres groupes ont été nourris pendant 2h (P3r2), 6h (P3r6), ou 24h (P3r24) avant d'être sacrifiés (**figure 17**).

Pour l'étude de la prolifération et de la migration cellulaires, une injection intrapéritonéale (1ml/100g de masse corporelle) d'une solution de BrdU à 3mg/ml a été pratiquée chez une partie des animaux, 1h, 12h ou 24h avant le sacrifice (**Article 2**).

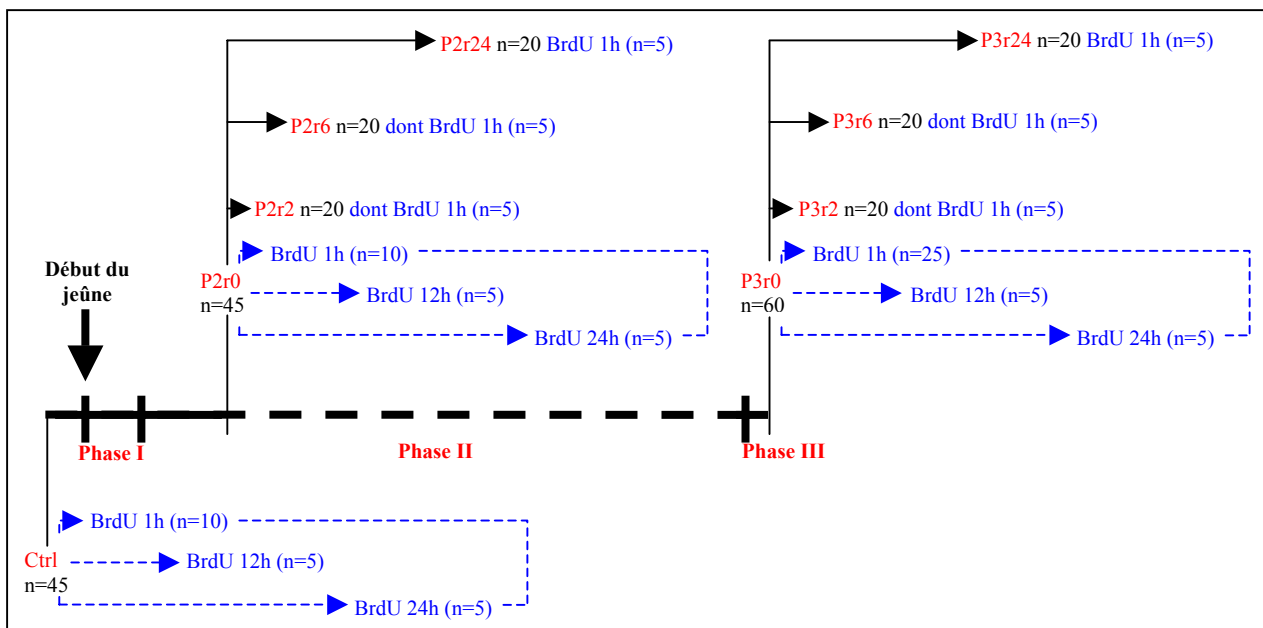


Figure 17. Protocole expérimental. Quarante cinq rats ont été nourris *ad libitum* (Ctrl). Parmi ces animaux, dix ont eu une injection de BrdU 1h avant d’être sacrifiés, cinq 12h avant et cinq 24h avant. Les autres rats ont été mis à jeun. Quarante cinq rats ont été sacrifiés en phase II dont certains 1h (n=10), 12h (n=5) ou 24h (n=5) après une injection de BrdU. Des rats en phase II ont été réalimentés 2h (n=20), 6h (n=20) ou 24h (n=20). Cinq rats de chaque condition expérimentale (P2r2, P2r6 ou P2r24) ont eu une injection de BrdU 1h avant le sacrifice. Les autres rats ont poursuivi le jeûne jusqu’en phase III. Soixante rats ont été sacrifiés en phase III, dont certains 1h (n=25), 12h (n=5) ou 24h (n=5) après une injection de BrdU. Les autres rats en phase III ont été réalimentés 2h (n=20), 6h (n=20) ou 24h (n=20). Dans chaque cas (P3r2, P3r6, P3r24), cinq animaux ont reçu une injection de BrdU 1h avant d’être sacrifiés. Une expérience d’absorption intestinale de glucose a été réalisée *in vivo* chez dix rats contrôles, dix rats en phase II et douze rats en phase III. La muqueuse intestinale a été prélevée chez tous les animaux (n=270) en vue des différents traitements histologiques, biochimiques et de biologie moléculaire.

2.2. Analyses réalisées

2.2.1. Dosages plasmatiques

Afin de confirmer *a posteriori* l’état métabolique des animaux, un échantillon de sang a été prélevé au moment du sacrifice pour le dosage des métabolites plasmatiques (glucose, β -hydroxybutyrate et urée), de la corticostérone et de l’insuline. Le β -hydroxybutyrate est un produit de la cétogenèse qui est importante en phase II, tandis que l’urée provient de la dégradation des protéines en phase III (cf. **Revue Bibliographique 1.2.1.1**). Les concentrations plasmatiques de glucose, de β -hydroxybutyrate et d’urée ont été dosées par des

méthodes enzymatiques colorimétriques, tandis que la corticostéronémie et l'insulinémie ont été dosées par méthode ELISA (**Articles 2, 3 et 4**).

2.2.2. Prélèvements de tissus

Le duodénum et le jéjunum ont été prélevés à la sortie du pylore, pesés, puis découpés en segments qui ont été traités séparément selon les différents types d'analyse envisagés.

2.2.3. Analyses moléculaires

Le niveau de l'expression des gènes codant pour SGLT1, GLUT5, GLUT2, la PEPCK, et la Glc6Pase a été mesuré sur des échantillons de muqueuse intestinale de rats à jeun, nourris et réalimentés, par northern blot (**Article 4**).

Etant donnée la faible quantité d'ARNm des cytokines dans les tissus non-inflammés, les niveaux d'expression des gènes codant pour TNF α , TGF β 1 et Cdx2 ont été mesurés par RT-PCR (transcription réverse et réaction de polymérisation en chaîne) semi-quantitative (**Article 3**).

2.2.4. Analyses biochimiques

Les quantités de protéine de SGLT1, GLUT5, GLUT2, la PEPCK, la Glc6Pase (**Article 4**) et de TNF α , TGF β 1 et Cdx2 (**Article 3**) ont été mesurées par western blot.

Des mesures d'activités enzymatiques de la lactase, de la sucrase-isomaltase, de la PEPCK et de la Glc6Pase (**Article 4**) ont été réalisées.

Dans tous les cas, les protéines totales ont été dosées par la technique de l'acide bicinchoninique (**Article 3 et 4**).

2.2.5. Mesures *in vivo*

Des mesures d'absorption intestinale de glucose ont été réalisées *in vivo* (**Article 4**).

2.2.6. Analyses morphologiques et histologiques

Des observations de la structure de la muqueuse intestinale en fonction de l'état nutritionnel des animaux (à jeun, nourri, réalimenté) ont été réalisées en microscopie électronique à balayage conventionnelle (CSEM) et environnementale (ESEM) (**Articles 1, 2 et 3**).

Des marquages immunocytochimiques du BrdU (**Article 2**), de TGFβ1 et de Cdx2 (**Article 3**), des transporteurs d'hexoses et des enzymes néoglucogéniques (**Article 4**) et une détection par méthode TUNEL des cellules en apoptose (**Article 2 et 3**) ont été réalisés sur des coupes transversales d'intestin de 6μm.

La coloration de coupes semi-fines (1,5μm) a permis le comptage des cellules en mitose (**Article 2**).

Enfin, l'utilisation d'un microscope électronique à transmission a permis une observation sur des coupes ultra-fines (60nm) des changements ultrastructuraux induits par l'apoptose (**Article 2 et 3**).

Résultats – Discussion

Article 1 : Utilisation de l'ESEM en biologie, comparaison avec le CSEM

Article 2 : Effets du jeûne et de la réalimentation sur la morphologie et les mécanismes cellulaires jéjunaux chez le rat en fonction du niveau de déplétion des réserves corporelles

Article 3 : Apoptose intestinale chez des rats à jeun et réalimentés en relation avec l'état métabolique et hormonal

Article 4 : Néoglucogenèse intestinale et absorption du glucose chez le rat en fonction de la disponibilité des réserves énergétiques

Résultats complémentaires

Article 1 : Utilisation de l'ESEM en biologie, comparaison avec le CSEM

1. Introduction

Ce premier article est méthodologique. Il présente les avantages et les inconvénients de l'utilisation en biologie du mode conventionnel (CSEM) et du mode environnemental (ESEM) du microscope électronique à balayage.

Le microscope électronique à balayage permet l'observation de surfaces à un grossissement important (jusqu'à 300 000 fois pour certains appareils). Classiquement, les échantillons biologiques sont observés dans une chambre en vide poussé (0 Torr), ce qui nécessite une préparation préalable : fixation, déshydratation et métallisation. Il s'agit là du mode conventionnel, appelé ainsi depuis qu'est apparue au début des années 90 une innovation technologique permettant de modifier les conditions « environnementales », c'est-à-dire les paramètres de pression, température et composition en gaz dans la chambre de l'échantillon. Grâce à ce nouveau mode environnemental, les tissus biologiques peuvent être observés à l'état frais, sans préparation préalable, immédiatement après prélèvement.

Dans cette étude, nous avons réalisé une observation en CSEM et en ESEM de la muqueuse jéjunale de rats contrôles, à jeun (en phase II ou III) et réalimentés.

2. Article



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Caroline Habold, Suzanne Dunel-Erb, Claudine Chevalier, Pierre Laurent, Yvon Le Maho, Jean-Hervé Lignot

Observations of the intestinal mucosa using environmental scanning electron microscopy (ESEM) ; comparison with conventional scanning microscopy (CSEM).

Micron 2003, 34 : 373-379

Pages 373-379 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

[http://dx.doi.org/10.1016/S0968-4328\(03\)00080-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-4328(03)00080-5)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

3. Résultats – Discussion

L'ESEM a permis d'observer la muqueuse de l'intestin grêle immédiatement après prélèvement, sans préparation préalable et par conséquent, sans dommages artéfactuels liés à la manipulation des échantillons. Il s'agit donc d'un instrument très intéressant pour une étude des altérations induites par un jeûne sur le tissu. Cependant, en l'absence de préparation, les villosités sont recouvertes d'un film muqueux fortement hydraté, qui limite le pouvoir de résolution. De plus, chaque observation est unique, l'échantillon ne pouvant être conservé. En CSEM par contre, les échantillons sont fixés, déshydratés et métallisés, ce qui permet leur observation à de très forts grossissements ainsi que leur conservation. ESEM et CSEM sont donc deux techniques complémentaires pour l'observation des changements subis par un tissu tels que les effets induits par le jeûne sur la muqueuse intestinale.

Article 2 : Effets du jeûne et de la réalimentation sur la morphologie et les mécanismes cellulaires jéjunaux en fonction du niveau de déplétion des réserves corporelles chez le rat

1. Introduction

Un jeûne entraîne une atrophie de la muqueuse intestinale avec une diminution de la hauteur des villosités induite par une réduction de la prolifération cellulaire dans les cryptes et de la migration des cellules des cryptes dans les villosités. De plus, l'apoptose au sommet des villosités et l'extrusion des cellules dans la lumière intestinale augmentent (**cf. Revue Bibliographique 3.1.1**). Malgré l'importance de cette atrophie tissulaire qui augmente avec la durée du jeûne, la muqueuse intestinale est totalement restaurée après trois jours de réalimentation suite à un jeûne de trois à quatre jours mais aussi après une phase III de jeûne comme le montre l'étude préliminaire de Dunel-Erb *et al.* (2001).

Dans notre étude, nous avons pu comparer les effets des phases II et III de jeûne sur la morphologie et sur la prolifération de l'épithélium jéjunal, et nous avons recherché les mécanismes cellulaires impliqués dans sa restauration après réalimentation.

2. Article



[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

C. Habold, C. Chevalier, S. Dunel-Erb, C. Foltzer-Jourdainne, Y. Le Maho & J.-H. Lignot

Effects of the fasting and refeeding on jejunal morphology and cellular activity in rats in relation to depletion of body stores.

Scandinavian Journal of Gastroenterology 2004, 39(6) : 531-539

Pages 531-539 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

3. Résultats – Discussion

Les observations à l'ESEM ont permis de confirmer l'augmentation de l'atrophie des villosités intestinales au cours du jeûne. Cependant, alors que la prolifération et la migration cellulaires diminuent au cours de la phase II de jeûne, le nombre de cellules en phase S et en mitose et la vitesse de migration cellulaire augmentent en phase III, jusqu'à être significativement supérieurs aux valeurs des animaux nourris. D'autre part, des cellules en apoptose sont observables au sommet des villosités chez les animaux nourris et en phase II, mais pas en phase III de jeûne. Ces résultats confirment l'hypothèse d'une phase II qui serait une phase d'économie d'énergie avec l'épargne des protéines corporelles, tandis que la phase III serait une phase d'anticipation de la réalimentation marquée par une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales intestinales et un arrêt de l'apoptose pouvant signifier la préservation des entérocytes matures. Ainsi, la muqueuse intestinale serait prête à absorber les nutriments dès que l'alimentation serait restaurée. Ceci coïncide avec un comportement de recherche alimentaire de l'animal et l'utilisation des protéines structurales pour la dépense énergétique. De plus, la reprise des divisions cellulaires déjà pendant la phase III de jeûne permet d'expliquer pourquoi la restauration de la muqueuse intestinale est complète après trois jours de réalimentation suite à une phase III comme à une phase II de jeûne malgré une atrophie des villosités plus importante.

Cette étude montre par ailleurs un épaissement des villosités intestinales chez des rats nourris seulement une demi-heure après une phase II de jeûne. Comme la prolifération cellulaire n'a pas repris à ce moment-là, cet épaissement doit être causé par un phénomène mécanique comme l'extension de la *lamina propria* qui serait induite par des contractions des myofibrilles (Moore *et al.*, 1989 ; Blikslager & Roberts, 1997) ou par une augmentation de la pression sanguine et lymphatique (Starck & Beese, 2002). Cette hypothèse devrait être confirmée par une étude plus approfondie de la *lamina propria* après réalimentation. Nous avons déjà pu observer une dilatation des vaisseaux lymphatiques chez les animaux réalimentés, ainsi que la présence d'AQP1 au niveau de l'endothélium de ces vaisseaux (**Figure 18**).

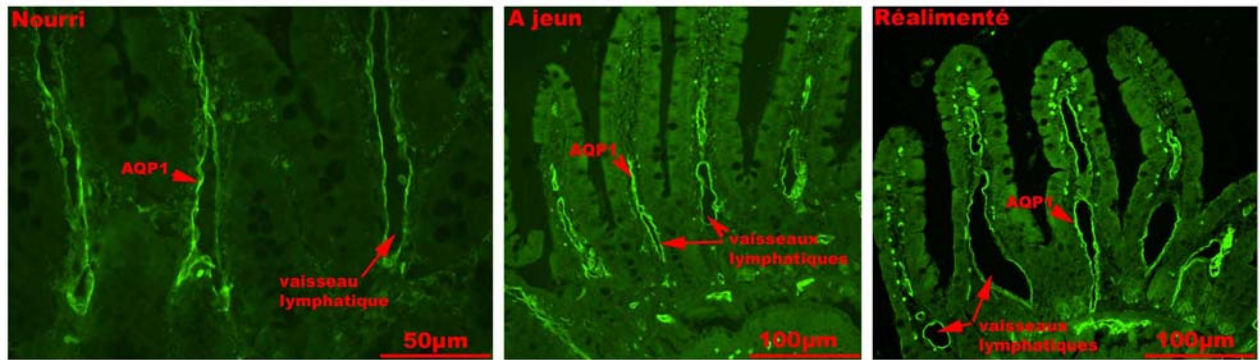


Figure 18. Immunomarquage d'AQP1 au niveau de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques.

L'extension de la *lamina propria* entraînerait alors la migration d'entérocytes immatures des cryptes dans les villosités intestinales chez les rats réalimentés après une phase II de jeûne, avant même que la prolifération dans les cryptes ne reprenne (Goodlad *et al.*, 1988). La restauration de la muqueuse intestinale est enfin parachevée par une importante prolifération cellulaire dans les cryptes.

Article 3 : Apoptose intestinale chez des rats à jeun et réalimentés en relation avec l'état métabolique et hormonal

1. Introduction

L'étude précédente nous a permis de montrer l'existence d'une corrélation entre l'état métabolique des animaux à jeun et l'occurrence des phénomènes apoptotiques au sommet des villosités intestinales. La disparition de l'apoptose en phase III coïncide avec l'augmentation du catabolisme protéique induit par l'élévation de la concentration plasmatique de corticostérone.

L'interaction de cytokines ($\text{TNF}\alpha$ et $\text{TGF}\beta 1$) ou de facteurs de transcription (Cdx2) avec leur récepteur joue un rôle majeur dans le déclenchement des voies de signalisation conduisant à l'apoptose (cf. **Revue Bibliographique 2.2.2. et 2.2.3.**). Cependant, la sécrétion de ces cytokines est diminuée par les glucocorticoïdes (Elitsur *et al.*, 1998 ; Schaeffer *et al.*, 2000). Nous avons donc mesuré le niveau de l'expression des gènes ainsi que la quantité de protéine de $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta 1$ et Cdx2 au cours des phases II et III du jeûne et après réalimentation.

2. Article

Intestinal apoptotic changes linked to metabolic status in fasted and refed rats

Running title: Intestinal apoptosis according to metabolic condition

Caroline Hbold¹, Charlotte Foltzer-Jourdainne², Christine Arbiol¹, Yvon Le Maho¹,
Jean-Hervé Lignot¹

¹CNRS, Centre d'Ecologie et Physiologie Energétiques,
23 rue Becquerel, STRASBOURG cedex 2, F-67087, France ;
²INSERM, U381, 3 avenue Molière, Strasbourg, F-67200, France.

Correspondence to: Caroline Hbold Centre d'Ecologie et Physiologie Energétiques C.N.R.S.
23 rue Becquerel. 67087 STRASBOURG; France.
E-mail address: caroline.hbold@c-strasbourg.fr

Abbreviations: Cdx2: Caudal-related homeodomain protein, RT-PCR: Reverse Transcription
– Polymerase Chain Reaction, TGFβ1: Transforming Growth Factor β1, TNFα: Tumor
Necrosis Factor α.

Summary

Intestinal apoptosis and expression of apoptosis inducers TNF α , TGF β 1, and Cdx2, were studied according to the two different metabolic and hormonal phases which characterize long-term fasting: the long period of protein sparing during which energy expenditure is derived from lipid oxidation (phase II), and the later phase characterized by a rise in body protein utilization and in plasma corticosterone (phase III). Apoptosis was further studied in 2, 6 and 24h refed rats. Morphological apoptotic events were observed through environmental and conventional scanning electron microscopy and TUNEL test was used to characterize the final stages of apoptotic death. The gene and protein expressions of TNF α , TGF β 1, and Cdx2 were measured. Apoptotic events and TNF α , TGF β 1, and Cdx2 gene and protein expressions did not vary significantly during phase II compared to normally-fed animals. However, phase III fasting induced an arrest in intestinal epithelial apoptosis, along with a 92%, 58% and 25% decrease in TNF α , TGF β 1 and Cdx2 mRNAs, respectively ($P < 0.05$). The amounts of TNF α , TGF β 1 and Cdx2 protein decreased by 70%, 36% and 25%, respectively ($P < 0.05$). Apoptosis was restored rapidly after 2h refeeding following phase III, accompanied by a significant increase in TNF α , TGF β 1 and Cdx2 mRNA and protein levels, compared to the phase III fasting values ($P < 0.05$). The concomitant decreases in cytokines plus Cdx2 and in apoptotic cells during phase III suggest the preservation of enterocytes during this critical fasting period in order to optimize nutrient absorption as soon as food is available and thus, to rapidly restore body mass.

Keywords: Body reserves depletion, apoptosis, corticosterone, cytokines.

Introduction

Three distinct metabolic phases have been described during a fast (Goodman *et al.*, 1980; Le Maho *et al.*, 1981; Cherel *et al.*, 1988; Koubi *et al.*, 1991). During the first phase (phase I), glycogen stores are completely exhausted and fat stores are progressively used. This phase lasts only a few hours in rats. The second phase (phase II) corresponds to a phase of economy with the mobilization of fat stores for energy expenditure whereas body proteins are efficiently spared. The third phase (phase III) is characterized by an increasing protein catabolism caused by a rise in plasma corticosterone levels. During this later phase, there is a clear change in behavior which promotes food foraging, therefore anticipating a lethal depletion of energy stores (Koubi *et al.*, 1991). In rats, fasting during either phase II or phase III induces a significant decrease in the size of intestinal villi and thus, in the small intestine mass (Dunel-Erb *et al.*, 2001). Also, during the phase of protein sparing (phase II), cell proliferation in crypts and cell migration along the crypt-villus axis decrease, whereas apoptosis at the tip of the villi is maintained (Habold *et al.*, 2004). In phase III however, when the rat has reached a critical threshold in body reserves utilization, intestinal cell proliferation and migration increase significantly compared to phase II fasted and normally-fed rats. In parallel, we observed an arrest of apoptotic events at the tip of the villi. The increase in cell proliferation and the preservation of absorptive cells are concomitant with a rise in locomotor activity reflecting the search for food (Koubi *et al.*, 1991) and should prepare the mucosa to nutrient absorption as soon as food is available. The aim of the current work is to further evaluate the intestinal apoptotic changes linked to the metabolic state of fasted rats.

Intestinal epithelial cell renewal rate is dependent on a tightly-regulated balance between cell proliferation in crypts and apoptosis at the tip of the villi (Potten and Allen, 1977; Luciano *et al.*, 1997; Grossmann *et al.*, 1998). The well-described apoptotic process in enterocytes (Shibahara *et al.*, 1995; Luciano *et al.*, 1997; Potten, 1997; Grossmann *et al.*, 1998; Westcarr *et al.*, 1999; Aschoff *et al.*, 2000; Marshman *et al.*, 2001; Grossmann *et al.*, 2002) is identified by morphological changes such as loosening of epithelial cell contacts, shedding of brush border (Luciano *et al.*, 1997), shrinkage of enterocytes with numerous vacuoles and nuclear condensation and fragmentation (Shibahara *et al.*, 1995). Apoptotic enterocytes are mainly localized at the tip of the villi (Westcarr *et al.*, 1999; Grossmann *et al.*, 2002; Groos *et al.*, 2003). Some studies also relate the localization of apoptotic cells in intestinal crypts (Potten, 1997; Marshman *et al.*, 2001). The cellular morphological changes are the final results of a

cascade of biochemical events (Huppertz *et al.*, 1999) leading to the activation of caspases (CysteinyI-aspartic acid proteases). Once activated, caspases degrade a variety of cytoskeletal proteins (Kayalar *et al.*, 1996; Caulin *et al.*, 1997) responsible for enterocytes shrinkage and activate nucleases, inducing DNA fragmentation. During the normal course of the development of the animal, apoptosis is activated as a response to specific endogenous factors such as TNF α , TGF β 1, and caudal-related homeodomain protein Cdx2 (Oberhammer *et al.*, 1992; Fesus, 1993; Freund *et al.*, 1998). Apoptosis can increase after exposure to cytotoxic compounds, hypoxia, viral infection, changing levels of specific hormones, and fasting. A short period of starvation (less than 3 days) has been shown to increase apoptosis in the small intestine mucosa (Jeschke *et al.*, 2000; Fukuyama *et al.*, 2001; Iwakiri *et al.*, 2001). However, other authors (Luciano *et al.*, 1995) have related a decrease in apoptosis following a 3-day starvation period. The effects of longer periods of fasting and also refeeding on apoptotic events in the small intestine remain almost unknown and intestinal apoptosis has never been studied by other authors in relation to whole body metabolism.

In this study, we evaluate the effects of phase II and phase III fast and refeeding on apoptotic events in the jejunal epithelium. Apoptosis was studied at the level of cell morphology through Scanning Electron Microscopy (SEM), and cell biology using the TUNEL test to characterize the final stages of apoptotic death. The concomitant variation of proapoptotic cytokines (TNF α , TGF β 1) and intestine specific transcription factor Cdx2 were analyzed by RT-PCR in order to determine gene expressions, and by western blot in order to quantify TNF α , TGF β 1 and Cdx2 protein level. Finally, TGF β 1 and Cdx2 protein distribution along the crypt-villus axis was investigated by immunohistochemical detection. Since apoptotic events may also be affected by glucocorticoids, plasma corticosterone was determined by enzyme immunoassay.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats weighing 300g were obtained from Iffa-Credo (Lyon, France). The animals were housed individually in leucite cages with a wire mesh floor to minimize coprophagia, and were maintained at 23°C with a 12-hour light period. They had free access to the control diet (A03 pellets from UAR, Epinay-sur-Orge, France) consisting of 23% (by mass) protein, 51.1% carbohydrates, 4.3% fat, 4% cellulose, 5.6% minerals, and 12% water. The rats had free access to water throughout the experiments. They were weighed every day between 9.00 and 10.00 a.m. Our experimental protocol followed the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) guide for care and use of laboratory animals.

Experimental procedures

After a one week acclimatization, rats were killed as control animals (Ctrl, n=15), whereas the other rats were food-deprived. The fasting phases (II, III) were determined by calculating the specific daily rate of body mass loss dM/Mdt (g/kg/day) for each animal (dM represents the loss of body mass during $dt=t_1-t_0$ and M is the rat body mass at t_0). Phase II lasted between one and ten days. A first group of rats was killed in the fifth day of phase II (P2r0, n=15), whereas three other groups were refed during 2h (P2r2, n=5), 6h (P2r6, n=5), or 24h (P2r24, n=5) following phase II, and then killed. Four other groups continued fasting until the second day of phase III, reaching an average of twelve days of fasting. One group was killed in phase III (P3r0, n=15), whereas the three others were refed during 2h (P3r2, n=5), 6h (P3r6, n=5), or 24h (P3r24, n=5) following phase III, and then killed. All animals survived the phase II and phase III fasting procedure.

The animals were killed between 9.00 and 10.00 a.m. The jejunum was removed, weighed, and cut into segments. The segments were then treated separately depending on the analysis considered (CSEM, ESEM, immunohistochemistry, RT-PCR, western blotting).

Plasma parameters

Blood samples were collected immediately after sacrifice to measure plasma concentrations of urea and corticosterone in all experimental groups. To assess the metabolic state for each animal, plasma urea was determined with an Urea Nitrogen Kit (Sigma Diagnostics, St Louis, USA), according to the manufacture's guidelines. The plasma concentration of corticosterone was determined with an Enzyme Immunoassay Kit (Assay Designs Inc., Ann Arbor, USA).

Environmental Scanning Electron Microscopy

Samples of jejunal mucosa were placed in 1% glutaraldehyde and buffered saline for 30s to block mucus secretion, and then viewed with a Philips XL-30 ESEM. The pressure in the sample chamber was maintained at 5 Torr and the temperature at 4°C, in order to hold a relative humidity rate of 80% at the sample surface.

Conventional Scanning Electron Microscopy

Jejunal mucosal samples were fixed for 2h at 4°C in 5% glutaraldehyde in 0.05M cacodylate buffer (pH=7.4), post-fixed 1h in 1% osmium tetroxide, and dehydrated. Pieces were then dried with hexamethyldisilazane. After being mounted on stubs, the samples were coated with gold and examined with a Philips XL-30 ESEM.

TUNEL assay procedure

Samples were fixed 2h in 3% paraformaldehyde, dehydrated and embedded in paraffin for tissue sectioning. 6- μ m-thick tissue sections were then cleared of paraffin and rehydrated. The tissue sections were treated with 2N HCl for 30min at 37°C and with 0.1% trypsin 30min at 37°C, and then, analyzed with an in situ Cell Death Detection Kit, fluorescein (Roche, USA) according to the manufacture's guidelines. Each experiment set up by TUNEL reaction mixture without terminal transferase served as negative control. Samples pre-treated with DNase (2mg/mL) served as positive controls. Sections were examined with a fluorescent microscope (Zeiss Axioplan) equipped with the appropriate filter set (450-590nm bandpass excitation filter).

RT-PCR analysis

Total RNA from jejunal mucosa was extracted by the method of Chomczynski and Sacchi (1987). cDNA was synthesized from 2 μ g total RNA in 25 μ L reaction buffer (Finnzymes OY, Finland) containing 1 μ L of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Finnzymes OY, Finland), oligo(dT)₁₇ primer (50pM, Eurogentec, Belgium) and 0.2mM of deoxynucleotide triphosphate (Promega, France), (60min at 42°C). cDNA was then amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers (Table I). The PCR reactions were carried out in 10 μ L Red'Y'StarMix (Eurogentec, Belgium) diluted to a final volume of 20 μ L, 50pM of each primer and 1 μ L of the cDNA mixture. cDNAs were amplified for a determined number of cycles (Table I) as follows: hot starting for 10min at 95°C, denaturation for 45s at 94°C,

annealing at 50°C for 45s, and elongation at 72°C for 45s. PCR products were resolved on a 3% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. The staining intensity was evaluated using the Molecular Analyst software (Bio-Rad Laboratories, USA). Results were expressed as relative densitometric units, normalized to the values of a phosphoribosomal protein mRNA used as internal control.

Western blotting

Jejunal mucosa was scraped free of the underlying tissue and thoroughly homogenized in 10% (wt./vol.) ice-cold sample buffer [10mmol/L Tris-HCl, 10% SDS, 0.10mol/L DTT, 1% protease inhibitor cocktail (Sigma, Saint Louis, USA), pH 7.4]. After centrifugation (90min, 30000g), the supernatant containing mucosal proteins was collected. Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid method and western blotting was conducted using standard techniques (Hames, 1996). In brief, samples (40µg protein) were solubilized and denatured by incubation at 80°C for 10min in a buffer comprising 62.5mmol/L Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, and 45mmol/L β-mercaptoethanol, pH 6.8, and denatured proteins separated by SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gels (Laemmli, 1970). Proteins were electroblotted onto PVDF membranes and immediately processed for immunodetection at room temperature. After blocking the membranes for 1 hour with PBS buffer containing 2.5% BSA (to block non-specific binding sites), the membranes were incubated for 1hour with the primary antibody (polyclonal rabbit anti-rat TGFβ1 [anti-LC-(1-30] generously provided by Dr. K. C. Flanders; monoclonal mouse anti-human Cdx2, BioGenex, San Ramon, Ca, USA; polyclonal rabbit anti-human TNFα, Genzyme Diagnostics, Cambridge, USA) diluted in PBS containing 1% BSA. Control blots were also run simultaneously using equivalent dilutions of either pre-immune serum or immune serum pre-incubated for 1 hour at room temperature with the peptide antigen. Following washes (3x15min) in PBS containing 0.1% BSA, membranes were incubated for 2 hours with an alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody diluted 1/10000 in PBS. Bound antibodies were visualized by incubating the blots in a substrate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitro blue tetrazolium, Chemicon) for 3min at room temperature. The level of immunoreactivity was then measured as peak intensity (arbitrary units) using an image capture and analysis system (Scion Image Analysis).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on paraffin sections. For the immunohistochemical study of the distribution of Cdx2, rehydrated sections were treated with HCl and then, preincubated for 30min with a blocking solution containing 10% normal goat serum in PBS. Sections were incubated with a mouse anti-human Cdx2 antibody (BioGenex, San Ramon, Ca, USA) for 2h at room temperature. After washes in PBS, the sections were incubated for 1h with Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes). Sections were mounted with anti-bleaching mounting medium and examined with a fluorescent microscope. TGFβ1 immunolocalization was performed by the standard extravidin-biotin-peroxidase complex technique. Briefly, endogenous peroxidase was inactivated by incubating the sections with 3% hydrogen peroxide for 10min at 37°C. Tissue was then preincubated with 10% normal goat serum before incubation 2h at 37°C with rabbit anti-rat TGFβ1 polyclonal antibody anti-LC-(1-30) (generously provided by Dr. K. C. Flanders). Sections were then treated with biotinylated goat anti-mouse IgG and labeled with horseradish peroxidase-conjugated extravidin. Diamino-benzidine was used for color development (3min). Sections were mounted with Eukitt and examined with a Zeiss microscope.

Statistical analysis

Data are presented as mean value +/- SEM. Statistical comparisons of experimental data were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test by using the software Sigmastat (Jandel). The level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Determination of the metabolic status

Body mass loss

The calculation of the specific daily rate of body mass loss dM/Mdt (g/kg/day) permitted the determination of the three fasting phases and a daily monitoring of the physiological status for each animal through fasting (figure 1). With this monitoring, all the animals survive the prolonged starvation procedure and can be successfully refed. The first fasting phase (phase I) lasted only a few hours and was characterized by a rapid decrease in dM/Mdt . The specific daily body mass loss then reached a steady rate (approximately 55g/kg/day) representing phase II and finally, strongly increased which was characteristic of phase III.

Plasma urea

Plasma urea, a product of protein catabolism, is reported in Table II. There were no differences in plasma urea concentration between control, phase II fasted rats and refed rats following phase II. A phase III fast induced a 3.7-fold significant increase in urea concentration. Uremia then decreased in rats after 6h refeeding following phase III.

ESEM and CSEM observations of apoptotic events on jejunal samples

Environmental Scanning Electron Microscopy makes it possible to examine fresh, lightly fixed biological specimens (neither dehydrated, nor gold coated) without artifacts linked to sample manipulation and treatment. A morphological study of apoptotic events at the tip of the villi was therefore possible for our 9 experimental groups (figure 2, a to i). These observations were made along the jejunum for 5 animals per group. Apoptotic zones were observed at the villi tips in control (figure 2a) and phase II fasted rats (figure 2b), but very few apoptotic events could be seen in phase III fasted rats (figure 2c) and in rats refed 2 and 6h following phase II (figure 2, d and e). In animals refed 24h following phase II (figure 2f), and in those refed following phase III (figure 2, g to i), the intestinal villi tips looked like those in controls. Observations made at higher magnifications with Conventional Scanning Electron Microscopy (figure 2, j to l) showed apoptotic cells being extruded from the epithelium and losing their microvilli in control (figure 2j) and in phase II fasted rats (figure 2k) but not in phase III fasted rats (figure 2l).

TUNEL detection of apoptotic cells

TUNEL reaction was used to characterize apoptotic cells with genomic DNA fragmentation. TUNEL-positive cells could be observed at the tips of the villi in control and phase II fasted rats (figure 3, a and b). Only a few apoptotic cells could be seen in animals refed 2h and 6h after a phase II fast (figure 3, d and e). Numerous TUNEL-positive cells could be seen again after 24h refeeding following phase II (figure 3f). In phase III, no apoptotic cells could be detected at the tip of intestinal villi (figure 3c). However, after refeeding following phase III, numerous TUNEL-positive cells could be observed in the whole epithelium of the villi (figure 3, g to i).

TNF α and TGF β 1 gene expressions and protein levels

To evaluate the possible role of TNF α and TGF β 1 in intestinal apoptosis during phase II and phase III fasting and after refeeding, their gene and protein expressions were analyzed using a semi-quantitative RT-PCR and western blotting techniques. TNF α and TGF β 1 were expressed in the small intestine mucosa (figures 4 and 5). However, TNF α was only lightly expressed, as indicated by the high number of PCR cycles needed to detect its mRNA (Table I).

TNF α gene expression and protein level (figure 4A and B) did not vary during a phase II fast compared to control animals. However, TNF α mRNA levels were very low in animals refed 2h and 6h after phase II compared to controls and phase II fasted rats, but no significant difference in the amounts of TNF α protein could be detected. A phase III fast strongly reduced TNF α gene expression and protein level. After 2h refeeding following phase III, the amount of TNF α mRNA exhibited a 7.5-fold increase compared to the control value, and a 94-fold increase compared to the phase III value. It then decreased during 6h and 24h refeeding following phase III, but was still higher than in control rats. TNF α protein level rose to control value after only 2h refeeding following phase III.

TGF β 1 (figure 5A and B) gene expression and protein level did not vary during a phase II fast compared to controls, but a significant increase was observed between animals refed 2h following phase II and control and phase II fasted animals. TGF β 1 gene expression and protein level were then lowered to control values in 6h and 24h refed rats following phase II. During phase III fasting, TGF β 1 mRNA level and protein amount were decreased by 58% and 36%, respectively. After refeeding following phase III, TGF β 1 gene expression and protein level increased and rapidly reached the control values.

TGFβ1 localization

TGFβ1 was localized in the cytoplasm of intestinal epithelial cells, and particularly in the apical part of the enterocytes (figure 5C). It was observed in the upper third of the intestinal villi in control and refeed rats, but was weakly expressed in phase III fasted rats.

Cdx2 gene expressions and protein levels

Cdx2 gene expression and protein level (figure 6A and B) did not change during a phase II fast. However, a significant increase was observed after 2h refeeding following phase II. After 6h refeeding, Cdx2 gene expression and protein level were then lowered to control values. A phase III fast induced a 25% decrease in Cdx2 mRNA level and protein amount. After refeeding following phase III, Cdx2 gene expression and protein level increased and rapidly reached the control values.

Cdx2 localization

Cdx2 was localized in the nuclei of intestinal cells and showed a decreasing gradient along the crypt-villus axis (figure 6C). A decrease in the expression of Cdx2 protein was observed in phase III fasted animals compared to controls, accompanied by an uniform distribution along the crypt-villus axis. The number of labeled nuclei increased in animals refeed 2h following either phase II or phase III. In P2r2 animals, the labeling was higher in the crypts and lower in villus tips resulting in a crypt-villus gradient more pronounced than in controls, whereas it was observed along the whole crypt-villus axis in the P3r2 group.

Plasma corticosterone

Plasma corticosterone reported in table II was measured in order to evaluate the contribution of glucocorticoids in apoptotic changes during fasting. Plasma corticosterone concentration showed a 13-fold increase in P2r0 fasted animals compared to controls, but it was not significant. After refeeding following a phase II fasting period, plasma corticosterone concentration was lower compared to control values. In phase III fasted rats, plasma corticosterone concentration exhibited a 370-fold significant increase compared to controls, and a 29-fold increase compared to P2r0 fasted rats. Refeeding following phase III induced a rapid decrease in plasma corticosterone.

Discussion

This study provides evidence that the different apoptotic events described in the small intestinal epithelium during fasting and refeeding is closely related to the different metabolic states of prolonged fasting. During phase II fasting, *i.e.* when the energy requirements are mostly derived from lipid oxidation, changes in intestinal villus apoptosis were not obvious compared to normally-fed animals. However, a phase III fast, characterized by an increase in protein utilization as a substitute fuel for lipids, induced an arrest of apoptotic events accompanied by significant modifications in the expression of the proapoptotic cytokines TNF α and TGF β 1 and of the intestinal specific transcription factor Cdx2. Whereas refeeding after phase II induced a reduction in apoptosis, refeeding following phase III rapidly restored apoptosis at the villi tips and normalized TNF α , TGF β 1 and Cdx2 expressions. This study together with the previous one (Habold et al, 2004) show the specificity of the epithelial cell kinetics during a phase III fast characterized by an arrest of apoptotic events and by a renewal of enterocytes preparing a physiologically functional epithelium able to digest and absorb nutrients at a novel period of refeeding. All these cellular events (arrest of apoptosis and increased proliferation) are deferred to the time of refeeding after a phase II fast.

We clearly demonstrate a difference in the occurrence of apoptotic events in the intestinal mucosa according to the different metabolic phases through fasting. During the phase of lipid oxidation (phase II), apoptosis was observed at the villi tips like in normally-fed animals. In phase III however, when the depletion in lipid reserves has reached about 80% of the initial stores, no apoptotic cells could be observed at the tips of the villi. This may explain the conflicting results obtained in previous studies. Apoptosis appeared to increase after a very short (1-day) starvation period (Iwakiri *et al.*, 2001). Because of such a small fasting duration, the rats used in this study and weighing 250-300g were most probably in a phase of lipid oxidation (phase II). During a longer starvation period (3 days), data obtained in younger rats (200-250g) with less adiposity showed on the contrary, an arrest in DNA fragmentation (Luciano *et al.*, 1995). These animals may not have been in the same hormonal and metabolic state as in the Iwakiri's study (2001), and were likely in a phase of protein catabolism (phase III).

From these data, it appeared necessary to further evaluate the effects of phase II and phase III starvation periods on early apoptotic markers and particularly on TNF α , TGF β 1, and Cdx2 normally present in the gastrointestinal mucosa. TNF α is a cytokine involved in enterocytes apoptosis. Mice treated with TNF α show an important villus atrophy (Piguet *et al.*, 1999). TNF α also promotes epithelial cell proliferation at low doses and inhibits cell growth at high concentrations (Trauth *et al.*, 1989; Fesus, 1993; Hsu *et al.*, 1996; Kaiser and Polk, 1997; Diab-Assef *et al.*, 2002). It is secreted in the intestinal mucosa by immune competent cells present in the *lamina propria*, by intraepithelial lymphocytes (Fiocchi, 1997) and also by enterocytes (Ruemmele *et al.*, 2002). The changes in TNF α protein expression in fasted and refeed rats are concomitant with those in the number of TUNEL-positive cells. The decrease in TNF α protein during phase III may induce the arrest of enterocyte apoptosis at the tip of the villi thus preventing the intestinal mucosa from further degradation during long-term fasting. In addition, the decrease in TNF α may also favor the increase in crypt cell proliferation previously observed in phase III (Habold *et al.*, 2004). Finally, by its effects on both apoptosis and proliferation, TNF α may contribute to the preservation of the mucosal integrity during phase III. Just 2h after refeeding following phase III, the increase in TNF α gene and protein levels may explain the occurrence of apoptotic cells. During phase II fasting, the absence of significant changes in TNF α expression is well correlated with the absence of variations in apoptotic events. However, the lack of TNF α modifications during refeeding following phase II shows that this cytokine may not be implied in the reduction of apoptosis at this stage.

TGF β 1 is a multipotent cytokine playing an important role in regulating intestinal epithelial cell growth and differentiation (Roberts and Sporn, 1993; Massague, 1996). It is an inhibitor of crypt cell proliferation (Kurokawa *et al.*, 1987; Barnard *et al.*, 1989) and has a proapoptotic role by regulating gene transcription of proteins associated with apoptosis such as Bcl-2 family members (Hague *et al.*, 1998). In our study, TGF β 1 gene and protein expressions did not vary during the phase II fast. This result is in accordance with the absence of modifications in apoptotic events during a phase II fast. However, despite the marked drop in villus apoptosis after 2h refeeding following phase II, a rapid increase in TGF β 1 mRNA level and protein expression was observed. In our previous study (Habold *et al.*, 2004), we demonstrated that refeeding after a phase II fast induces a rapid restoration of villus morphology. At this stage, TGF β 1 could stimulate mucosal repair by increasing extracellular matrix protein synthesis (Ignatz and Massague, 1986), and epithelial cell restitution (Ciacci *et al.*, 1993; Dignass *et al.*, 1993). A similar increase in the gene expression of TGF β 1 has also

been reported in aberrant crypt foci and in the surrounding mucosa of refed rats (Caderni *et al.*, 2002). After 6h of refeeding following phase II, when mucosal morphology has almost completely recovered (Habold *et al.*, 2004), the levels of TGF β 1 mRNA and protein returned to the control value of normally-fed animals. The severe decrease in TGF β 1 gene and protein expressions and the faint epithelial labeling observed in phase III fasting animals could partly explain the disappearance of intestinal apoptotic cells and the increase in crypt cell proliferation (DNA synthesis and mitosis) occurring during this metabolic phase (Habold *et al.*). TGF β 1 mRNA level and protein expression returned to control value after only 2h refeeding following a phase III accompanied by a more intense epithelial labeling. This result correlates the rapid restoration of apoptotic events in the intestinal epithelium after refeeding. The homeobox gene Cdx2 is known to reduce intestinal cell proliferation, and to stimulate cell differentiation and apoptosis (Suh *et al.*, 1994; Suh and Traber, 1996; Lorentz *et al.*, 1997; Freund *et al.*, 1998; Domon-Dell *et al.*, 2002). To our knowledge, the effects of short-term and prolonged fasting on Cdx2 *in vivo* are still scanty. Only one study indicates a decrease in Cdx expression in 48h fasted chicks (Geyra *et al.*, 2002). Our results show that Cdx2 is located in the nuclei of crypt cells and of differentiating enterocytes with a decreasing crypt-villus gradient. The amount of Cdx2 protein decreased during the phase III fast and the crypt-villus gradient became barely detectable. This suggests that the absence of Cdx2 in epithelial cells from the villi tips may be involved in the arrest of apoptosis during phase III and its faint expression in crypt cells may favor the increase in cell proliferation previously observed during this fasting phase (Habold *et al.*, 2004). An increase in Cdx2 gene and protein expressions was observed after 2h of refeeding following a phase II. This increase in Cdx2 expression in crypt cells may delay the rise in cell proliferation to 6h after refeeding following a phase II fast (Habold *et al.*, 2004). In addition, the decrease in the expression of Cdx2 at the villi tips may favor the arrest of apoptosis after a phase II fast. In contrast, Cdx2 was equally expressed along the whole crypt-villus axis in rats refed 2h following a phase III. These changes may restore apical apoptosis and delay the increase in cell mitosis (Habold *et al.*, 2004).

From these results, it seems that the decrease in TNF α , TGF β 1 and Cdx2 mRNA and protein levels could induce the arrest of apoptosis during phase III and increase crypt cell proliferation therefore preserving differentiated cells and regenerating the epithelium in order to optimize absorption as soon as food is available.

The phase III fasting period is characterized by a strong increase in plasma corticosterone (Belkhou *et al.*, 1994; this study) and is also concomitant with the decrease in cytokine expression in the jejunum, the increased cell proliferation rate in intestinal crypts and the arrest in apoptotic events at the villi tips. Furthermore, the role of glucocorticoids on cytokines secretion is well known since injection of glucocorticoids *in vivo* induces a decrease in TGF β 1 gene expression (Schaeffer *et al.*, 2000). Glucocorticoids also, negatively regulate TNF α expression in cultured myofibroblasts isolated from the jejunum (Schaeffer *et al.*, 2000) and suppress TNF α secretion by human *lamina propria* lymphocytes (Elitsur *et al.*, 1998). Finally, it has been shown that adrenalectomy leads to partial atrophy and disorganization of the villi architecture, associated with a decrease in crypt cell proliferation, and an increase in apoptotic cells at the tip of the villi (Foligne *et al.*, 2001). However, additional studies are needed to demonstrate the regulation of small intestinal cytokine expression by glucocorticoids during long-term fasting.

Therefore, in light of all these data, the level of energy depletion reached by fasting animals must be involved in the occurrence and disappearance of apoptosis in intestinal villi through fasting and after refeeding. The lack of apoptosis during phase III must preserve differentiated epithelial cells and could, therefore, optimize nutrient absorption after refeeding. Also, this arrest in apoptosis seems strongly correlated with the decreased expression of the homeoprotein Cdx2 and cytokines TNF α and TGF β 1. Finally, the decrease in Cdx2, TGF β 1 and TNF α gene and protein expressions may lead to the already observed increased cell proliferation rate inducing mucosal repair during the phase III fast, before food becomes available (Habold *et al.*, 2004). Preservation of absorptive cells and initiation of cell proliferation during phase III fasting is concomitant with a peak of locomotor activity in these animals induced by a rise in plasma corticosterone and reflecting the search for food (Koubi *et al.*, 1991; Challet *et al.*, 1995). The unaltered absorption capabilities of the intestine could then permit rapid food assimilation immediately after refeeding and thus, the restoration of the whole body condition. This could be crucial for surviving prolonged fasting, since animals entering phase III, have reached a critical depletion level in their lipid reserves and body proteins.

Acknowledgments:

We thank J.N. Freund and C. Domon-Dell for helpful discussion, and E. Martin for technical help. We are also grateful for K.C. Flanders for providing us the TGF β 1 antibody.

C.H. was recipient of a Nestlé Nutrition grant.

References

1. Aschoff AP, Günther E, Jirikowski GF (2000) Tissue transglutaminase in the small intestine of the mouse as a marker for apoptotic cells. Colocalization with DNA fragmentation. *Histochem Cell Biol* 113: 313-317.
2. Barnard JA, Beauchamp RD, Coffey RJ, Moses HL (1989) Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type beta. *Proc Natl Acad Sci* 86(5): 1578-82.
3. Belkhou R, Bechet D, Cherel Y, Galluser M, Ferrara M, le Maho Y (1994) Effect of fasting and thyroidectomy on cysteine proteinase activities in liver and muscle. *Biochim Biophys Acta* 1199(2): 195-201.
4. Caderni G, Perrelli MG, Cecchini F, Tessitore L (2002) Enhanced growth of colorectal aberrant crypt foci in fasted/refed rats involves changes in TGFbeta1 and p21CIP expressions. *Carcinogenesis* 23(2): 323-7.
5. Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG (1997) Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 138: 1379-1394.
6. Cherel Y, Robin JP, Le Maho Y (1988) Physiology and biochemistry of long-term fasting in birds. *Can J Zool* 66 :159-166.
7. Cherel Y, Groscolas R (1999) Relationships between nutrient storage and nutrient utilization in long-term fasting birds and mammals. In: Adams NJ & Slotow RH eds. *Proc 22 Int Ornithol Congr Durban*, p. 17-34.
8. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9.
9. Ciacci C, Lind SE, Podolsky DK (1993) Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* 105(1): 93-101.
10. Cuendet GS, Loten EG, Cameron DP, Renold AE, Marliss EB (1975) Hormone-substrate responses to total fasting in lean and obese mice. *Am J Physiol.* 228(1): 276-83.
11. Diab-Assef M, Reimund JM, Ezenfis J, Duclos B, Kedinger M, Foltzer-Jourdainne C (2002) The phosphodiesterase inhibitor, pentoxifylline, alters rat intestinal epithelial

- cell proliferation via changes in the expression of transforming growth factors. *Scand J Gastroenterol* 37(2): 206-14.
12. Dignass AU, Podolsky DK (1993) Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* 105(5): 1323-32.
 13. Domon-Dell C, Wang Q, Kim S, Kedinger M, Evers BM, Freund JN (2002). Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells. *Gut*. 50(4): 525-9.
 14. Elitsur Y, Lichtman SN, Neace C, Dosesco J, Moshier JA (1998) Immunosuppressive effect of budesonide on human lamina propria lymphocytes. *Immunopharmacology* 38(3): 279-85.
 15. Fesus L (1993) Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Lett* 328: 1-5.
 16. Fiocchi C (1997) Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am J Physiol* 273(4 Pt 1): G769-75.
 17. Foligne B, Aissaoui S, Senegas-Balas F, Cayuela C, Bernard P, Antoine JM, Balas D (2001) Changes in cell proliferation and differentiation of adult rat small intestine epithelium after adrenalectomy: kinetic, biochemical, and morphological studies. *Dig Dis Sci* 46(6): 1236-46.
 18. Freund JN, Domon-Dell C, Kedinger M, Duluc I (1998) The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem Cell Biol* 76(6): 957-69.
 19. Fukuyama K, Iwakiri R, Noda T, Kojima M, Utsumi H, Tsunada S, Sakata H, Ootani A, Fujimoto K (2001) Apoptosis induced by ischemia – reperfusion and fasting in gastric mucosa compared to small intestinal mucosa in rats. *Dig Dis Sci* 46 (3): 545-549.
 20. Geyra A, Uni Z, Gal-Garber O, Guy D, Sklan D (2002) Starving affects CDX gene expression during small intestinal development in the chick. *J Nutr* 132(5): 911-7.
 21. Goodman MN, Larsen PR, Kaplan MN, Aoki TT, Young VR, Ruderman NB (1980) Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. *Am J Physiol* 239: E277-E286.
 22. Groos S, Reale E, Hünefeld G, Luciano L (2003) Changes in epithelial cell turnover and extracellular matrix in human small intestine after TPN. *J Surg Res* 109(2): 74-85.

23. Grossmann J, Mohr S, Lapetina EG, Fiocchi C, Levine AD (1998) Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 274: G1117-G1124.
24. Grossmann J, Walther K, Artinger M, Rümmele P, Woenckhaus M, Schölmerich J (2002) Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *Am J Gastroenterol* 97: 1421-1428.
25. Habold C, Chevalier C, Dunel-Erb S, Foltzer-Jourdainne C, Le Maho Y, Lignot JH. Effects of fasting and refeeding on jejunal morphology and cellular activity in rats in relation to body stores depletion. *Scand J Gastroenterol*, in press.
26. Hague A, Bracey TS, Hicks DJ, Reed JC, Paraskeva C (1998) Decreased levels of p26-Bcl-2, but not p30 phosphorylated Bcl-2, precede TGFbeta1-induced apoptosis in colorectal adenoma cells. *Carcinogenesis* 19(9): 1691-5.
27. Hames, B. D (1996) One dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, second edition (ed. B. D. Hames and D. Rickwood), pp. 1-147. Oxford, UK: Oxford University Press.
28. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84(2): 299-308.
29. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P (1999) The apoptosis cascade – morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 200: 1-18.
30. Ignatz RA, Massague J (1986) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261(9): 4337-45.
31. Iwakiri R, Gotoh Y, Noda T, Sugihara H, Fujimoto K, Fuseler J, Aw TY (2001) Programmed cell death in rat intestine: Effect of feeding and fasting. *Scand J Gastroenterol* 36: 39-47.
32. Jeschke MG, Debroy MA, Wolf SE, Rajaraman S, Thompson JC (2000) Burn and starvation increase programmed cell death in small bowel epithelial cells. *Dig Dis Sci* 45(2): 415-20.
33. Kaiser GC, Polk DB (1997) Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. *Gastroenterology* 112(4): 1231-40.
34. Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE (1996) Cleavage of actin by interleukin 1 β -converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2234-2238.

35. Koubi HE, Robin JP, Dewasmes G, Le Maho Y, Frutoso J, Minaire Y (1991) Fasting-induced rise in locomotor activity in rats coincides with increased protein utilization. *Physiol Behav* 50: 337-343.
36. Kurokawa M, Lynch K, Podolsky DK (1987) Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor beta inhibits proliferation and stimulates differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 13; 142(3): 775-82.
37. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15; 227(259): 680-5.
38. Le Maho Y, Vu Van Kha H, Koubi H, Dewasmes G, Girard J, Ferre P, Cagnard M (1981) Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long-term fasting geese. *Am J Physiol* 41: E342-E354.
39. Lindgard K, Stokkan KA, Le Maho Y, Groscolas R (1992) Protein utilisation during starvation in fat and lean Svalbard Ptarmigan (*Lagopus mutus hyperboreus*). *J Comp Physiol B* 162: 607-613.
40. Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Keding M, Freund JN (1997) Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 15; 139(6): 1553-65.
41. Luciano L, Gupta PD, Groos S, Adamski J (1995) Modulation of apoptosis by starvation: morphological and biochemical study of rat intestinal mucosa. *Cell Death and Diff* 2: 259-266.
42. Luciano L, Groos S, Sridhar Rao K, Gupta PD, Reale E (1997) Early morphological events during apoptotic process in enterocytes. *Rec Adv Microsc* 391-395.
43. Marshman E, Ottewell PD, Potten CS, Watson AJM (2001) Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine. *J Pathol* 195: 285-292.
44. Massague J (1996) TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 28; 85(7): 947-50.
45. Oberhammer FA, Pavelka M, Sharma S, Tiefenbacher R, Purchio AF, Bursch W, Schulte-Hermann R (1992) Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci* 15; 89(12): 5408-12.
46. Piguet PF, Vesin C, Donati Y, Barazzone C (1999) TNF-induced enterocyte apoptosis and detachment in mice: induction of caspases and prevention by a caspase inhibitor, ZVAD-fmk. *Lab Invest.* 79(4): 495-500.

47. Potten CS, Allen TD (1977) Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. *J Ultrastruct Res* 60: 272-277.
48. Potten CS (1997) Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol* 273(2 Pt 1): G253-G257.
49. Roberts AB, Sporn MB (1993) Physiological actions and clinical applications of transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Growth Factors* 8(1): 1-9.
50. Ruemmele FM, Beaulieu JF, Dionne S, Levy E, Seidman EG, Cerf-Bensussan N, Lentze MJ (2002) Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor alpha. *Gut* 51(6): 842-8.
51. Schaeffer C, Diab-Assef M, Plateroti M, Laurent-Huck F, Reimund JM, Kedinger M, Foltzer-Jourdainne C (2000) Cytokine gene expression during postnatal small intestinal development: regulation by glucocorticoids. *Gut* 47(2): 192-8.
52. Shibahara T, Sato N, Waguri S, Iwanaga T, Nakahara A, Fukutomi H, Uchiyama Y (1995) The fate of effete epithelial cells at the villus tips of the human small intestine. *Arch Histol Cytol* 58: 205-219.
53. Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG (1994) A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 14(11): 7340-51.
54. Suh E, Traber PG (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 16(2): 619-25.
55. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 21; 245(4915): 301-5.
56. Westcarr S, Farshori P, Wyche J, Anderson WA (1999) Apoptosis and differentiation in the crypt-villus unit of the rat small intestine. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31 (1): 15-30.

Table I:

Synthetic oligonucleotides and experimental conditions used in reverse transcription-polymerase chain reaction analysis

<i>Gene</i>	<i>Position</i>	<i>Size (bp)</i>	<i>Sequence</i>	<i>Cycling number</i>
Ribosomal phosphoprotein	340-360 847-828	486	5'-GTTACCAAGGAGGACCTCA-3' 3'-AGACACCTCTGCCTAATGTG-3'	23-25
Cdx2	578-600 649-672	250	5'-CCCAGCGGCCAGCGGCGAAACCT-3' 3'-TATTTGTCTTTTGTCCCTGGTTTTC-5'	28
TGFβ1	731-752 1415-1392	661	5'-GAAGTCACCCGCGTGCTAATGG-3' 3'-GGATGTAAACCTCGGACCTGTGTG-5'	28
TNFα	3033-3055 3178-3155	122	5'-TTCTGTGAAAACGGAGCTAAAC-3' 3'-TTTATTACGACTAAACCACTGGT-5'	37

Table II:

Plasma urea and corticosterone concentrations in control, fasted and refed rats

	<i>Urea g.L⁻¹</i>	<i>Corticosterone 10⁻⁹g.L⁻¹</i>
Ctrl	0.189 ± 0.007 ^a	83.98 ± 61.06 ^a
P2r0	0.203 ± 0.011 ^a	1077.42 ± 312.80 ^{ab}
P2r2	0.319 ± 0.025 ^{ab}	51.90 ± 29.35 ^a
P2r6	0.282 ± 0.014 ^{ab}	160.34 ± 72.61 ^a
P2r24	0.176 ± 0.015 ^a	607.31 ± 243.19 ^{ab}
P3r0	0.708 ± 0.068 ^b	31101.09 ± 6269.80 ^b
P3r2	0.598 ± 0.067 ^b	708.24 ± 175.74 ^{ab}
P3r6	0.448 ± 0.009 ^{ab}	1467.44 ± 523.99 ^{ab}
P3r24	0.243 ± 0.017 ^{ab}	678.42 ± 384.57 ^{ab}

Results are means ± SEM, n=6 rats per group. Within the same column, values with no letter in common are significantly different (P<0.05)

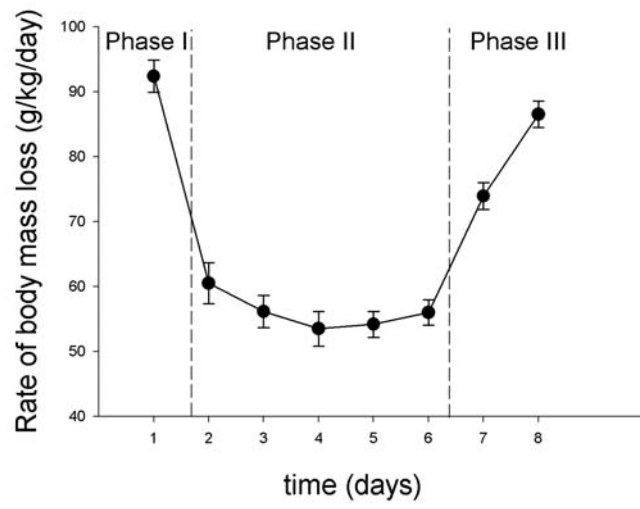


Figure 1: Rate of body mass loss (dM/Mdt, g/kg/day) in fasted rats. Mean \pm SEM (n=5).

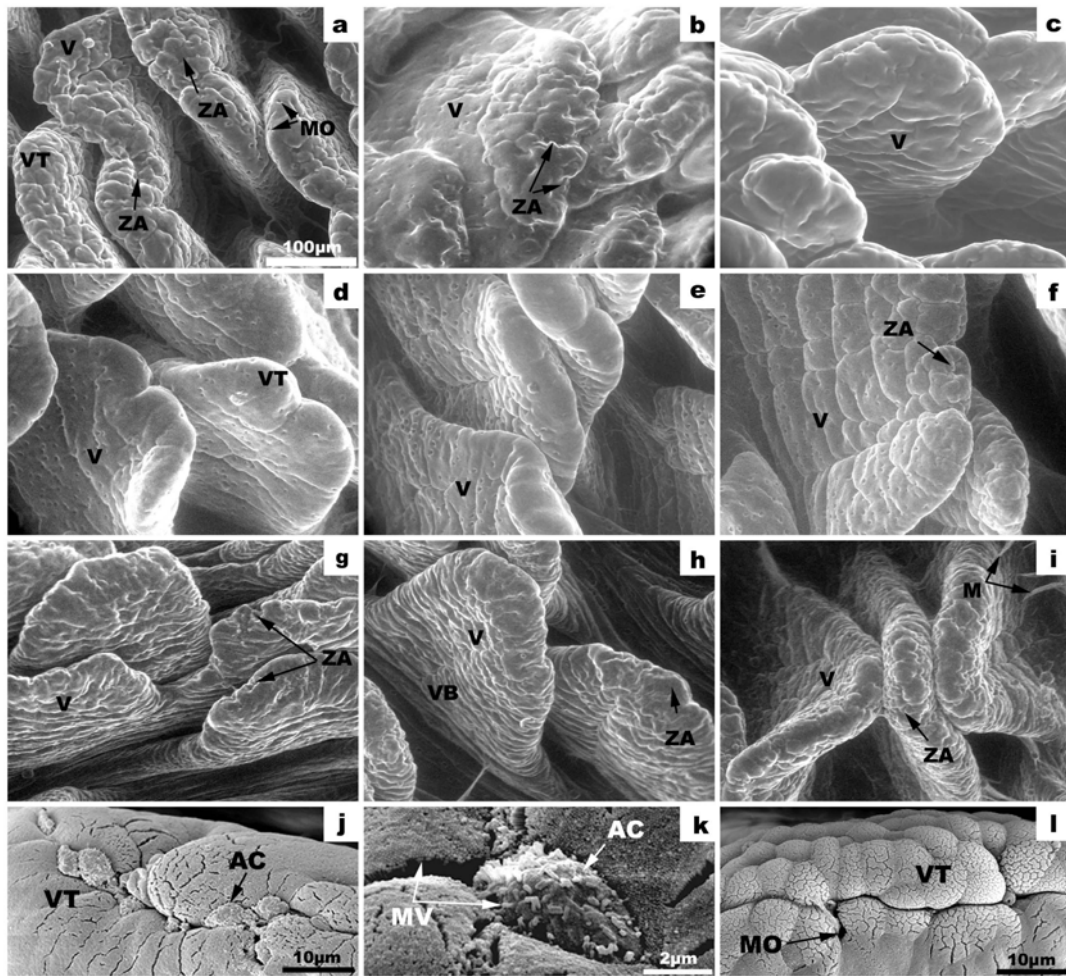


Figure 2: ESEM (a to i) and CSEM (j to l) observations of the morphological apoptotic changes in the jejunal mucosa of control (a, j), phase II fasted (b, k), phase III fasted (c, l) rats and in refeed rats 2h (d), 6h (e), 24h (f) after a phase II fast and 2h (g), 6h (h), 24h (i) after a phase III fast. V: villus, VT: villus tip, ZA: zone of apoptosis, MO: mucus orifice, VB: villus base, M: mucus, AC: apoptotic cell, MV: microvilli. Apoptotic zones are particularly evident at the villus tip in control (a, j), phase II fasted animals (b, k) and in 24h refeed animals following phase II (f) and 2, 6 and 24h refeed animals following phase III (g to i).

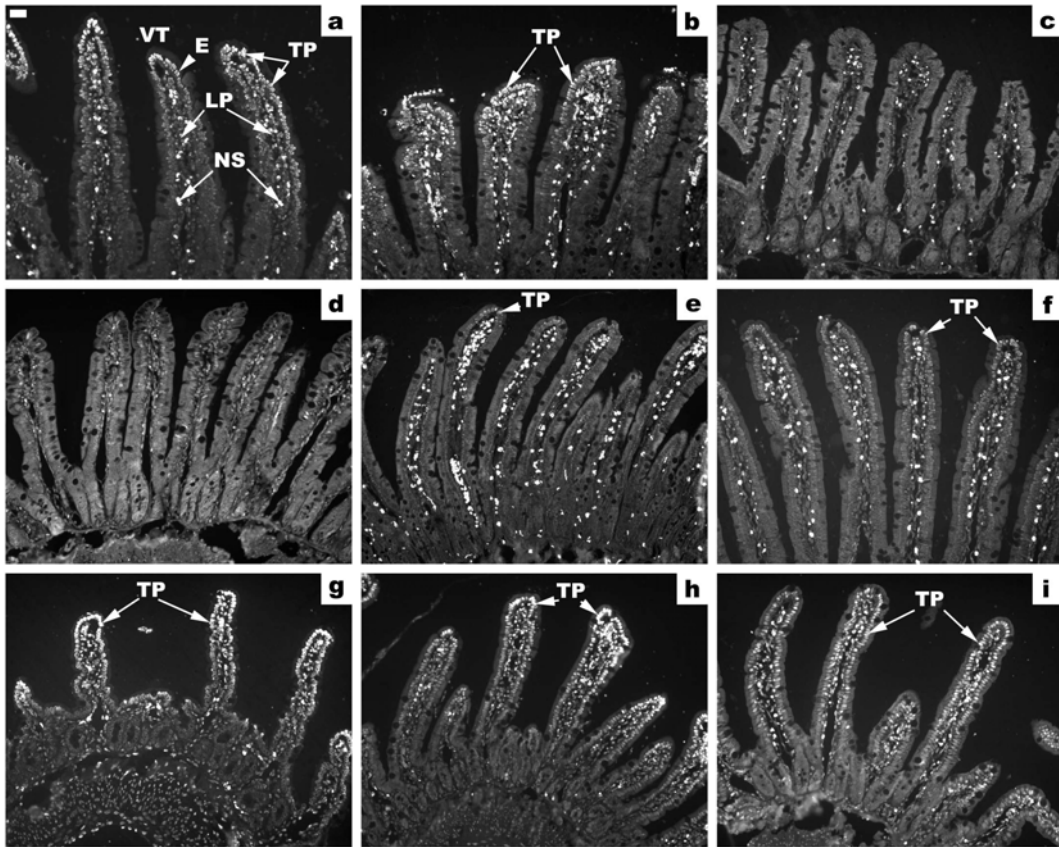


Figure 3: Localization of TUNEL-positive cells in the jejunal mucosa of control (a), phase II (b) and phase III fasted (c) rats, and in refed rats 2h (d), 6h (e), 24h (f) after a phase II fast and 2h (g), 6h (h), 24h (i) after a phase III fast. Bar=20 μ m. LP: *lamina propria*, E: epithelium, VT: villus tip, TP: TUNEL-positive nucleus, NS: non-specific labeling corresponding to red blood cells and immune cells. In control (a) and phase II fasted rats (b), and in 24h refed animals following phase II (f) and 2, 6 and 24h refed animals following phase III (g to i), the epithelial cells in the upper region of the villi were TUNEL-positive. In phase III fasted rats (c), there were no TUNEL-positive cells. Only a few TUNEL-positive cells could be seen in rats refed 2h (d) and 6h (e) following a phase II fast.

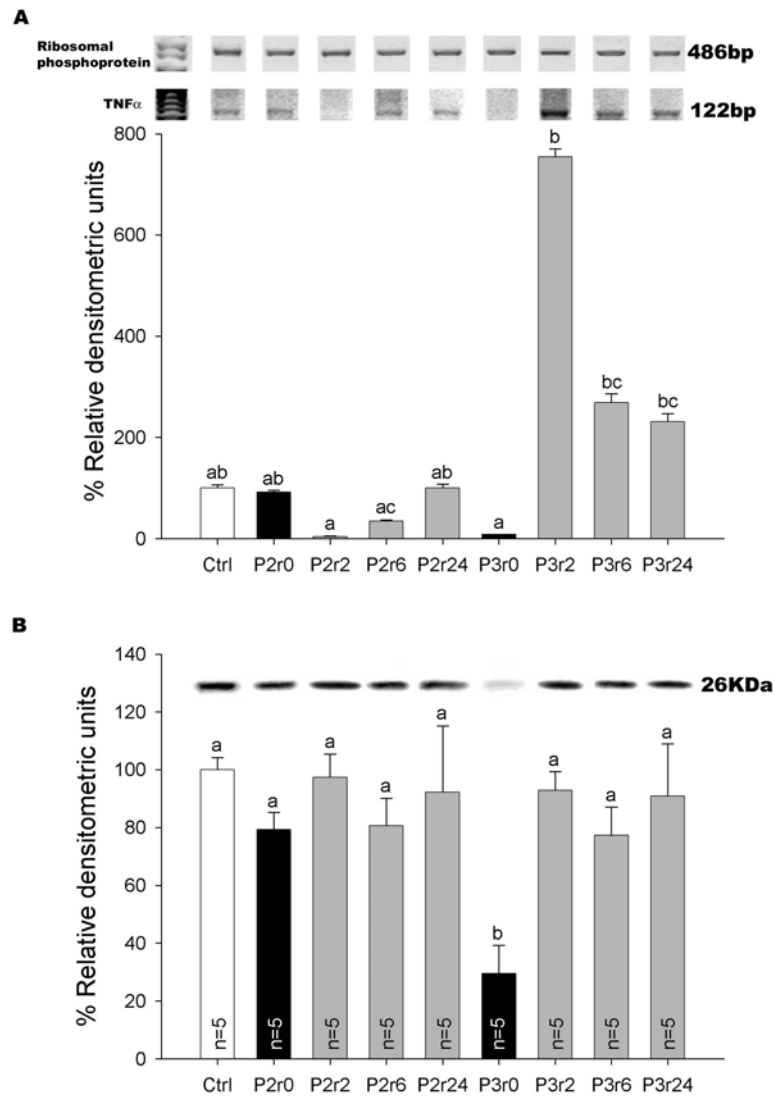


Figure 4: RT-PCR (A) and western blot (B) analysis of TNF α in Ctrl, P2r0 and P3r0 rats and after refeeding (P2r2, P2r6, P2r24, P3r2, P3r6, P3r24). Mean \pm SEM (n=5 per group). Values with no letters in common were significantly different ($P \leq 0.05$).

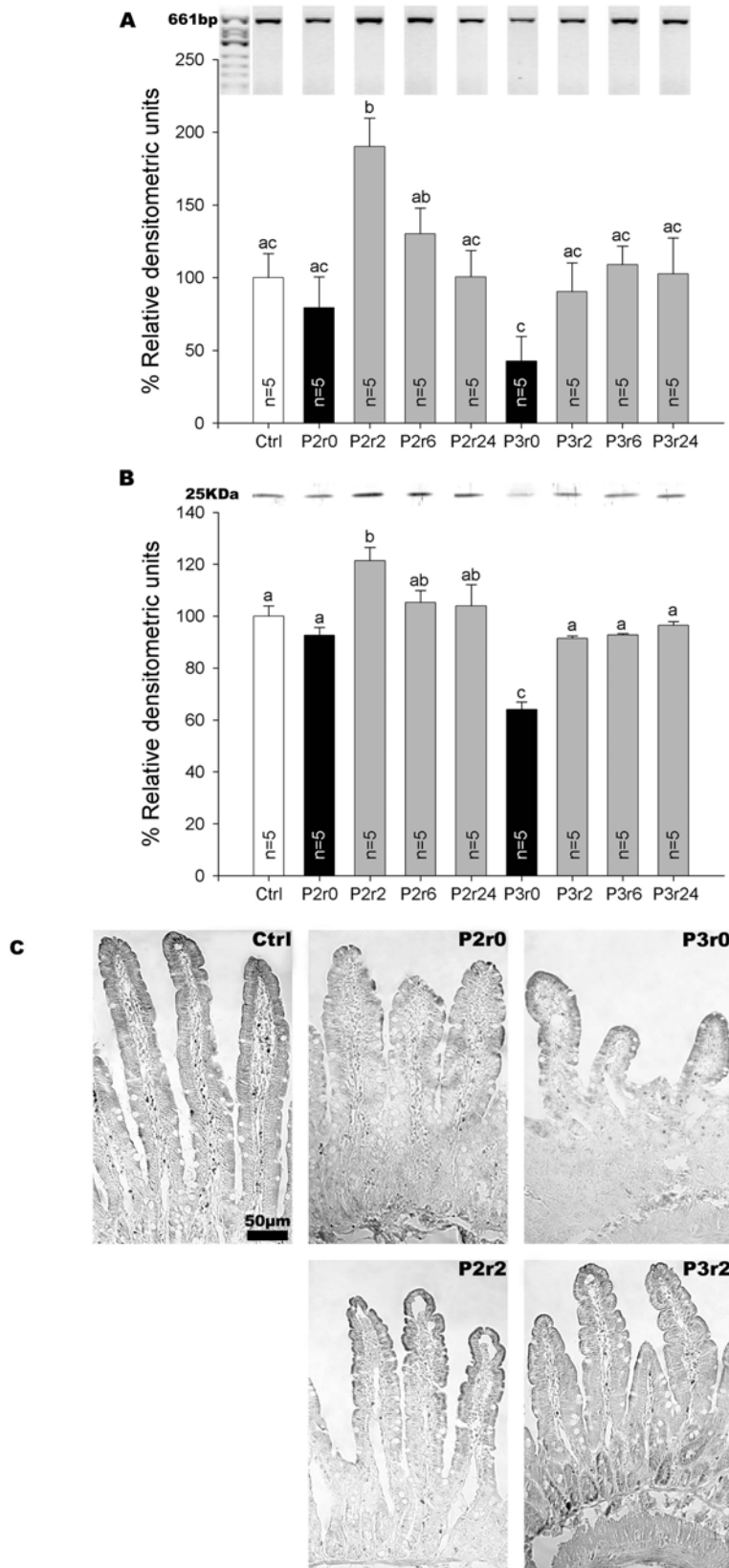


Figure 5: RT-PCR (A) and western blot (B) analysis of TGF β 1 in Ctrl, P2r0 and P3r0 rats and after refeeding (P2r2, P2r6, P2r24, P3r2, P3r6, P3r24). Mean \pm SEM (n=5 per group). (C) TGF β 1 immunohistochemical localization in Ctrl, P2r0, P3r0, P2r2 and P3r2 rats. TGF β 1 is localized in the cytoplasm of intestinal epithelial cells and is mainly observed in the intestinal villi of control and refed animals (6h and 24h refeeding data not shown).

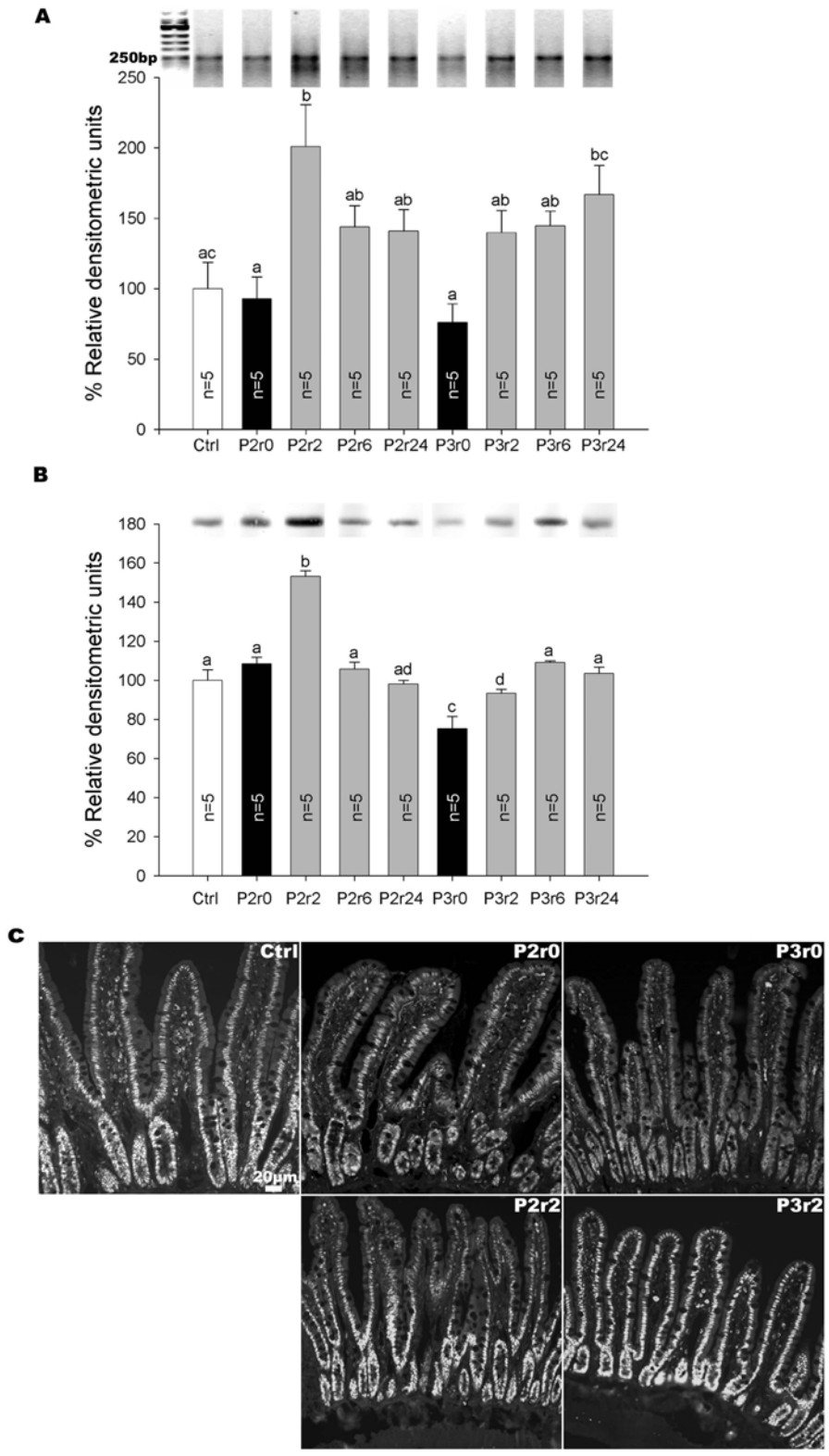


Figure 6: RT-PCR (A) and western blot (B) analysis of Cdx2 in Ctrl, P2r0 and P3r0 rats and after refeeding (P2r2, P2r6, P2r24, P3r2, P3r6, P3r24). Mean \pm SEM (n=5 per group). (C) Cdx2 immunohistochemical localization in Ctrl, P2r0, P3r0, P2r2 and P3r2 rats. Cdx2 is located in the nuclei of intestinal cells and is weakly expressed in phase III fasting animals.

3. Résultats – Discussion

Les observations en ESEM, CSEM, microscopie optique et électronique à transmission (TEM) confirment l'absence en phase III de jeûne de cellules en apoptose au sommet des villosités intestinales, comme cela avait déjà été montré par la technique TUNEL dans notre étude précédente. Cet arrêt de l'apoptose en phase III coïncide avec une diminution des niveaux d'expression des gènes codant pour TGF β 1, Cdx2 et TNF α et avec une baisse de la quantité de ces protéines. TGF β 1, Cdx2 et TNF α possèdent un effet pro-apoptotique et inhibent la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal (**cf. Revue Bibliographique 2.2.3.2.**). L'effet de TNF α sur la prolifération cellulaire est dépendant de sa concentration : une forte concentration de TNF α inhibe la prolifération cellulaire, tandis qu'une concentration basse la stimule. La diminution de TGF β 1, Cdx2 et TNF α en phase III pourrait donc être à l'origine de l'arrêt des phénomènes apoptotiques au sommet des villosités, mais expliquerait aussi l'augmentation de la prolifération cellulaire dans les cryptes. La préservation des entérocytes matures et l'accroissement de la prolifération cellulaire en phase III de jeûne suggèrent une préparation anticipée de la muqueuse intestinale à la réalimentation qui coïncide avec une augmentation de l'activité locomotrice chez le rat. Cette activité est induite par l'élévation de la corticostéronémie (Challet *et al.*, 1995) et correspond à un comportement de recherche alimentaire de l'animal dans son milieu naturel (Robin *et al.*, 1998).

La baisse de TGF β 1 et TNF α pourrait également être causée par l'augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone, puisque les glucocorticoïdes ont un effet inhibiteur sur la sécrétion des cytokines (Elitsur *et al.*, 1998 ; Schaeffer *et al.*, 2000). Pour vérifier cette hypothèse, nous envisageons de réaliser des surrénalectomies et des injections de corticostérone chez des rats en phase III avant de mesurer à nouveau les niveaux d'expression génique et les quantités de ces cytokines et d'étudier la prolifération cellulaire et l'apoptose.

La réalimentation des rats en phase III de jeûne entraîne une augmentation du niveau de l'expression génique et de la quantité de TGF β 1, Cdx2 et TNF α , et la restauration de l'apoptose au sommet des villosités.

Cette étude devrait être complétée par le dosage des cytokines circulantes notamment afin d'expliquer certaines différences observées entre le niveau d'expression génique et les quantités de TNF α . Il serait également intéressant d'utiliser des outils supplémentaires pour la

caractérisation de l'apoptose tels qu'une mesure de la quantité de caspases ou de produits de dégradation de ces enzymes.

Article 4 : Néoglucogenèse intestinale et absorption du glucose chez le rat en fonction de la disponibilité des réserves énergétiques

1. Introduction

Pendant un jeûne, le glucose est synthétisé par les voies de la néoglucogenèse à partir du glycérol libéré par la lipolyse (phase II) et des acides aminés issus du catabolisme protéique (phase III). Les organes néoglucogéniques sont le foie, le rein et l'intestin grêle. Ce dernier, à lui seul, synthétise plus d'un tiers de la production endogène totale de glucose au cours d'un jeûne de 72h chez le rat (Mithieux *et al.*, 2004). Les principaux précurseurs de la néoglucogenèse dans l'intestin grêle étant la glutamine et à un moindre degré le glycérol (Croset *et al.*, 2001), nous avons étudié la néoglucogenèse intestinale en fonction des phases II et III du jeûne et après réalimentation. Dans ce but, nous avons mesuré les niveaux d'expression génique, la quantité de protéines et l'activité de deux enzymes clés de la néoglucogenèse (**cf. Revue Bibliographique 1.1.1.1.2.**), la PEPCK et la Glc6Pase.

D'autre part, nous avons accordé un intérêt particulier à l'étude du transport intestinal de glucose qui est un substrat privilégié bien que non indispensable pour beaucoup de cellules. Nous avons donc mesuré les quantités d'ARNm et de protéine du transporteur apical de glucose sodium-dépendant SGLT1, du transporteur apical de fructose GLUT5, et du transporteur baso-latéral d'hexoses GLUT2, en fonction de l'état métabolique des animaux (nourris, en phase II ou III du jeûne, et après réalimentation). Nous avons également quantifié l'absorption de glucose *in vivo* chez des rats nourris, en phase II et en phase III de jeûne.

2. Article

Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats

Running title: Nutritional status and gut glucose metabolism

Caroline Habol¹, Charlotte Foltzer-Jourdainne², Yvon Le Maho¹,
Jean-Hervé Lignot¹ and Hugues Oudart¹

¹CNRS, Centre d'Ecologie et Physiologie Energétiques,
23 rue Becquerel, F-67087 STRASBOURG cedex 2, France;
²INSERM, U. 381, 3 avenue Molière, F-67200 Strasbourg, France.

Correspondence to: Hugues Oudart, Centre d'Ecologie et Physiologie Energétiques C.N.R.S. 23
rue Becquerel. 67087 STRASBOURG, France.

E-mail address: hugues.oudart@c-strasbourg.fr

Summary

Intestinal hexose absorption and gluconeogenesis have been studied in relation to refeeding after two different fasting phases: a long period of protein sparing during which energy expenditure is derived from lipid oxidation (phase II), and a later phase characterized by a rise in plasma corticosterone triggering protein catabolism (phase III). Such a switch in body fuel uses, leading to changes in body reserves and gluconeogenic precursors could modulate the intestinal gluconeogenesis and glucose transport. The sodium-glucose cotransporter 1 (SGLT1) gene and protein expressions are enhanced by a phase III fast, therefore allowing glucose absorption even at low concentrations as soon as food is available. Furthermore, an increase in epithelial permeability due to fasting may induce a paracellular movement of glucose. Intestinal gluconeogenesis is also enhanced by a phase III fast, as shown by the increased PEPCK and Glc6Pase gene expressions, protein levels and activities. The facilitative hexose transporters GLUT5 and GLUT2 are downregulated throughout the fast. In the absence of GLUT2, Glc6Pase could be involved in glucose release to the blood stream *via* membrane trafficking. Finally, refeeding triggered GLUT2 and GLUT5 synthesis and apical recruitment of GLUT2, to absorb larger amounts of hexoses.

Introduction

Glucose is transferred across the brush-border membrane of intestinal cells either by an energy-dependent Na⁺-dependent glucose transporter 1 (SGLT1) when its concentration does not exceed 30-50mM, or by diffusion at a higher concentration (1-3). Fructose is transported by a facilitative glucose transporter (GLUT5) (4). At the baso-lateral membrane of the cell, hexoses exit to the blood stream by facilitated diffusion *via* GLUT2 (5). GLUT2 can also be recruited to the brush-border membrane where it contributes to the absorption of glucose from the lumen (6, 7).

Adult rats fed diets enriched in glucose show a specific upregulation of glucose transport activity in both the brush border membrane (8) and the basolateral membrane (9). Also, during dietary restriction, the affinity of the carriers for sugars increases (10) and a 72h-fast causes an overall increase in glucose absorption in rats (11).

Fasting also induces an increase in gluconeogenesis in the small intestine which produces up to one third of endogenous glucose after 72 hours of fasting (12). The main precursors of gluconeogenesis in the small intestine are glutamine and glycerol to a much lesser extent (13). Two key gluconeogenic enzymes, the rate-limiting phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK, EC 4.1.1.32) involved in glucose production from glutamine, and glucose-6-phosphatase (Glc6Pase, EC 3.1.3.9) which catalyzes the dephosphorylation of glucose-6-phosphate to glucose, are expressed in the small intestine and are upregulated in 48h fasted rats (14, 15). After refeeding for 7h, PEPCK and Glc6Pase mRNA levels and activities are then restored to normally-fed values in the jejunum (14, 15).

Studies on intestinal hexose absorption and on intestinal gluconeogenesis during food deprivation have hitherto been restricted to relatively short periods of fasting and have never been carried out according to the metabolic changes occurring through fasting. However, during fasting, the glucose sources and gluconeogenic precursors vary in relation with changes in body fuels utilization characterizing three distinct phases (16, 17): after a rapid period of adaptation marked by the depletion of glycogen reserves (phase I), lipid stores are progressively oxidized whereas body proteins are efficiently spared (phase II). The later fasting phase is characterized by both a strong increase in protein utilization as a substitute fuel for lipids (phase III) and a rise in plasma corticosterone level. Also, changing hormone levels through fasting may play a role in the regulation of gluconeogenic enzymes in the small intestine and on intestinal glucose transporters. The aim of this work, therefore, is to examine

intestinal glucose absorption and production during distinct fasting phases and refeeding characterized by metabolic and hormonal changes (16-19).

Intestinal SGLT1, GLUT5 and GLUT2 gene and protein expressions were measured in phase II and phase III fasted rats. Since the energy load could first come from carbohydrate absorption after refeeding (11), gene and protein expressions of these transporters were also studied in 2, 6 and 24h refed rats following either phase II, or phase III. To further examine glucose absorption, intestinal glucose uptakes were measured *in vivo* in normally-fed, phase II and phase III fasting rats. Finally, intestinal gluconeogenesis was studied during phase II, during which the glycerol released from lipid oxidation may be the main gluconeogenic precursor, and during phase III, when the delivery of amino acids (as glucose precursors) to the gluconeogenic tissues increased markedly. In that way, PEPCK and Glc6Pase gene expressions, protein levels and activities were examined during the fasting phases and after refeeding.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats weighing 300g were obtained from Iffa-Credo (Lyon, France). Animals were housed individually in leucite cages with a wire mesh floor to prevent coprophagia, and were maintained at 23°C with a 12-hour light period. They were fed a standard diet (A03 pellets from UAR, Epinay-sur-Orge, France) and had free access to water throughout the experiments. They were weighed every day between 9.00 and 10.00h *a.m.* Our experimental protocol followed the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) guide for care and use of laboratory animals.

Experimental procedures

After one week acclimatization, rats were killed as control animals (Ctrl), whereas the other rats were food deprived. The fasting phases (II, III) were determined by calculating the specific daily rate of body mass loss dM/Mdt (g/kg/day) for each animal (dM represents the loss of body mass during $dt=t_1-t_0$ and M is the rat body mass at t_0). Phase II lasted on average ten days. A first group of rats was killed in phase II (P2r0) after five days fasting, whereas three other groups were refed during 2h (P2r2), 6h (P2r6), and 24h (P2r24) following phase II, and then killed. Four other groups continued fasting until the second day of phase III, reaching an average of twelve days fasting. One group was killed in phase III (P3r0), whereas the three others were refed during 2h (P3r2), 6h (P3r6), and 24h (P3r24) following phase III, and then killed. The duodenum and the jejunum were removed, weighed, and cut into segments. The segments were then treated separately depending on the analysis considered.

Plasma parameters and intestinal enzyme activities

Blood samples were collected immediately after sacrifice to measure plasma concentrations of urea, corticosterone, insulin and glucose in all experimental groups. Plasma urea was determined with an Urea Nitrogen Kit (Sigma Diagnostics, St Louis, USA) and plasma concentrations of corticosterone and insulin with Enzyme Immunoassay Kits (Assay Designs Inc. (Ann Arbor, USA) and Eurobio (Les Ulis, France), respectively). The plasma glucose concentration was measured using a glucose oxydase-peroxydase kit (Roche Diagnostics).

Glc6Pase activity was determined in the small intestinal mucosa as described by Rajas *et al.* (14), and the Jomain-Baum and Schramm (20) protocol was followed to measure PEPCK activity.

Northern blot analysis

Total RNA from duodenal and jejunal mucosa was isolated by the method of Chomczynski and Sacchi (21). Of total RNA, 5µg was electrophoresed per lane in an agarose gel. After electrophoresis, RNA was transferred to a nylon membrane (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) by vacuum blotting and then fixed on the membrane by UV light. Blots were probed with specific digoxigenin-end-labeled (5') antisense oligonucleotide probes (Eurogentec, Seraing, Belgium) using the method of Trayhurn *et al.* (22). The following probes were used: 5'-TGCCAGTCCCCCTGTGATGGTGTAAGGGCGG-3' for SGLT1 (GenBank D16101), 5'-GGACTGGGCCCCACGGCGTGTCTATGACGTA-3' for GLUT5 (GenBank L05195), 5'-CCGCCCCGCCTTCTCCACAAGCAGCACAGAGA-3' for GLUT2 (GenBank J03145), 5'-GGGTCAGCTCGGGGTTGCAGGCCAGTTGTTG-3' for PEPCK (GenBank XM_342593), 5'-CGGGACAGACAGACGTTTCAGCTGCACAGCCCA-3' for Glc6Pase (GenBank U07993). Slot-blots were stripped and re-probed with an 18S rRNA probe to correct for variations in RNA loading or blotting. The blots were analyzed by densitometry using Scion Image Software.

Western blot analysis

Total duodenal and jejunal proteins were isolated from the mucosa after centrifugation (90min, 30000g) in 10vol. (wt./vol.) ice-cold sample buffer [10mM Tris-HCl, 10% SDS, 15mg/mL DTT, 1% protease inhibitor cocktail (Sigma, Saint Louis, USA), pH 7.4], whereas the plasma membrane fractions were isolated by discontinuous sucrose density gradient centrifugation as described previously (23). Protein concentrations were determined by the Bicinchoninic Acid method. Western blotting was conducted using standard techniques (24). Proteins (25µg per lane) were separated by SDS-PAGE using 7% poly-acrylamide gels and electroblotted onto PVDF membranes before immunodetection processing. The membranes were incubated with the primary antibody [rabbit anti-rat SGLT1, Glut5, Glut2 (Chemicon), sheep anti-rat PEPCK (generously provided by Dr. D. K. Granner), rabbit anti-rat Glc6Pase (generously provided by Dr. G. Mithieux)]. Control blots were also run simultaneously using equivalent dilutions of either pre-immune serum or immune serum pre-incubated with the peptide antigen. Membranes were finally incubated with an alkaline phosphatase-conjugated

secondary antibody and the bound antibodies were visualized by incubating the blots in BCIP-NBT (Chemicon). The level of immunoreactivity was then measured as peak intensity (arbitrary units) using an image capture and analysis system (Scion Image Analysis).

Immunohistochemistry

Formalin-fixed intestinal samples embedded in paraffin were cut 6- μ m-thick and collected on poly-L-lysine-coated slides. Sections were cleared of paraffin, rehydrated and pre-incubated with a blocking solution containing normal goat serum. Sections were then incubated with the primary antibody [rabbit anti-rat SGLT1, Glut5, Glut2 (Chemicon) and Glc6Pase (generously provided by Dr. G. Mithieux)] and finally, with Alexa Fluor-labeled goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes). As controls, we used primary antibodies pre-absorbed with the respective peptides and preimmune serum. Sections were examined with a fluorescent microscope (Zeiss Axioplan 2) equipped with the appropriate filter set.

Glucose uptake measurements

Glucose uptake rate into the small intestine was determined by using the *in vivo* perfused intestinal segments technique. Normally-fed and phase II and phase III fasted rats were anesthetized prior to surgery using IP sodium pentobarbital (60mg/kg body mass) and placed on a heated (37°C) surgical table. After performing a laparotomy, the small intestine was isolated and the luminal contents removed by gently flushing with warm saline (0.9%) at 37°C. An intestinal loop was cannulated and a recirculating perfusion was started at a flow rate of 2mL/min with 10mL saline solution at 37°C containing 5mM glucose. The animals were killed after an absorptive period of 20min. The small intestine was excised and the mucosa was scraped free of the underlying tissue and weighed. Glucose concentration was estimated in the luminal content using a glucose oxydase-peroxydase kit (Roche Diagnostics). The absorption rate was calculated from the difference between the total amount of glucose injected initially and that recovered after the end of experiment. Blood glucose concentration was also measured before and after luminal perfusion.

Statistical analysis

Data are presented +/- SEM. Statistical comparisons of experimental data were performed by one-way and two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey post-hoc test by using the software Sigmastat (Jandel). The level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Body mass loss

The calculation of the specific daily rate of body mass loss dM/Mdt (g/kg/day) permitted the determination of the three fasting phases and a daily monitoring of the physiological status for each animal through fasting (figure 1). With this monitoring, all the animals survive the prolonged starvation procedure and can be successfully refed. The first fasting phase (phase I) lasted only a few hours and was characterized by a rapid decrease in dM/Mdt. The specific daily body mass loss then reached a steady rate (approximately 55g/kg/day) representing phase II and finally, strongly increased which was characteristic of phase III.

Plasma parameters

Plasma corticosterone was 13-fold not significantly higher in phase II fasted (P2r0) than in normally-fed rats (Ctrl), and 375- and 29-fold higher in phase III fasted (P3r0) than in controls and P2r0 rats, respectively (table I). It diminished after only 2h refeeding.

Uremia did not vary between control and P2r0 rats (table I). In phase III fasting, plasma urea concentration was 3.75- and 3.5-fold higher than in control and P2r0 rats, respectively. After refeeding following a phase III, urea concentration progressively decreased compared to the P3r0 value, but was still higher than in controls.

Plasma insulin concentration dropped in phase II and phase III fasted rats (table I). It increased after 2h refeeding following phase II and after 6h refeeding following phase III but remained lower than in the control group even after 24h refeeding.

Glycemia decreased by 2.5-fold in phase II and by 4.5-fold in phase III fasted rats compared to controls (table I). While plasma glucose concentration rapidly increased after only 2h refeeding following phase II, it was still significantly lower in animals refed for 24h following a phase III than in control animals.

SGLT1 gene and protein expressions

The level of SGLT1 gene (figure 2A) and protein (figure 2B) expressions did not significantly vary between control, phase II fasted and refed rats following phase II. In phase III, SGLT1 gene expression increased 1.6- and 2.1-fold compared to the control and P2r0 values, respectively. Also, the amount of SGLT1 protein rapidly rose in phase III and was more than 3-fold higher than in control and phase II fasted rats. The high level of SGLT1 gene

expression was maintained in refed animals following phase III, whereas its protein amount was lowered to control values. Changes in SGLT1 protein expression during fasting and after refeeding could also be observed through immunohistochemical labeling. As shown in figure 2C, SGLT1 was highly expressed in the brush border membrane of phase III fasted rats.

GLUT5 gene and protein expressions

While GLUT5 gene expression (figure 3A) did not vary, neither in phase II, nor in phase III fasted rats compared to controls, its protein amount (figure 3B) was significantly decreased by one half in these animals. The amounts of GLUT5 mRNA and protein were higher in rats refed following a phase III than following a phase II fast. GLUT5 immunolabeling (figure 3C) decreased during fasting, whereas it increased in the apical membrane of refed animals following phase III.

GLUT2 gene and protein expressions

GLUT2 gene expression (figure 4A) was decreased by 3.1- and 2.2-fold in phase II and phase III fasted rats, respectively, compared to controls, and its protein (figure 4B) was no more detectable in phase II and phase III fasted rats. After refeeding, the level of GLUT2 mRNA rapidly increased and the protein was already detected after 2h refeeding following either phase II, or phase III. The highest increase in GLUT2 mRNA and protein after refeeding could be observed in the P3r2 rats, where the values were no more different than the control ones. In control rats, GLUT2 was localized in the enterocytes baso-lateral membranes (figure 4C). In refed animals following phase III, an intense staining of GLUT2 could also be observed in the apical membrane.

In vivo glucose uptake measurements

Glucose absorption rate was expressed per milligram tissue and not per centimeter length, since intestinal villi and small intestine diameter were very reduced during fasting. Glucose was more absorbed in the small intestine of phase II and phase III fasted rats than of normally-fed rats (table II). Expressed per milligram of proteins, the results were virtually the same. Compared to normally-fed animals, glucose was 1.3- and 2.1- more absorbed in phase II and phase III fasted rats, respectively. As already shown, plasma glucose levels decreased progressively during fasting (table II). The glycemia rose in glucose perfused fasted rats but remained still lower than in controls.

PEPCK gene expression, protein level and activity

PEPCK mRNA (figure 5A) and protein levels (figure 5B) and PEPCK activity (figure 5C) did not vary between control, P2r0 and refed rats following phase II. However, a phase III fast induced a 4-, 13- and 30-fold increase in PEPCK mRNA, protein level and activity, respectively. These values remained still high after 2h refeeding following phase III. In these animals, the amount of PEPCK protein was even 2.5- and 32-fold higher compared to phase III fasted and control rats, respectively. PEPCK protein expression then decreased in rats refed 6h following phase III and was lower than in controls after 24h refeeding.

Glc6Pase gene expression, protein level and activity

Glc6Pase gene expression (figure 6A) did not vary between control and phase II fasted rats. The phase III fast induced a 10-, 2.3- and 2.1-fold increase in Glc6Pase mRNA, protein level (figure 6B) and activity (figure 6D), respectively. In refed animals following phase III, Glc6Pase mRNA level and activity decreased to control values, while no changes occurred after phase II. In refed animals following both phases, protein abundance decreased to levels lower than in controls. In control rats, Glc6Pase appeared to be in the epithelial cells along the whole villus axis and in all the intestinal villi (figure 6C). A cytoplasmic staining restricted to the apical part of the enterocytes immediately under the microvilli could be observed. In phase III fasted rats, the localization was similar but the staining appeared more intense.

Discussion

To our knowledge, it is the first study to investigate intestinal glucose absorption and gluconeogenesis according to body fuel availability. It appeared that during protein catabolism (phase III fast), the active way of glucose absorption is induced by an increase in SGLT1 in the brush border membrane, whereas the facilitated component of intestinal glucose transport is triggered at refeeding by an increase in GLUT2 translocated to the apical membrane. The study also shows an increase in intestinal gluconeogenesis during the phase III fasting period, during which the gluconeogenic precursors may be amino acids coming from protein catabolism, compared to the phase II fasting period, *i.e.* when glycerol may be the main gluconeogenic precursor.

Glucose transport

While a phase of lipid oxidation (phase II) did not induce any changes in SGLT1 gene and protein expressions, their levels were upregulated by a phase of protein catabolism (phase III). These results suggest that the metabolic status of phase III fasted rats, rather than the duration of fasting, enhanced SGLT1 gene expression and protein synthesis. Such an increase in active glucose transporter level may allow intestinal glucose absorption immediately after refeeding even at low concentrations. As illustrated by the *in vivo* glucose uptake measurements, glucose is massively absorbed in the intestine of phase III fasted rats. This increase in intestinal glucose uptake during the phase III fasting period may at least partly involved SGLT1. It can be related to the high level of corticosterone, as reported in the normal (25-27) and in the inflamed small intestine (28). Noteworthy, in the inflamed intestine glucocorticoids are able to restore the levels of SGLT1 (28). However, SGLT1 may not be solely involve in glucose absorption during fasting, since the 5mM glucose solution was also more absorbed during phase II fasting compared to normally-fed rats, without any increase in SGLT1 gene and protein expressions. GLUT2 was not detected and can also not be involved in glucose absorption during fasting. However, an increase in intestinal permeability which allows paracellular movement of macromolecules such as ovalbumin and bovine serum albumin has been observed during fasting and malnutrition (29-31). Therefore, in addition to the increase in glucose absorption through SGLT1 during a phase III fast, glucose could be absorbed through a paracellular pathway during phase II and phase III fasting. Refeeding following the phase III fast induced a decrease in SGLT1 protein amount which paralleled the decrease in

plasma corticosterone concentration. In contrast, the level of SGLT1 mRNA remained unchanged after refeeding suggesting a post-transcriptional mechanism of regulation induced by refeeding.

The amount of the facilitative hexose transporter GLUT5 protein was lowered during fasting and increased during refeeding. This is in accordance with previous studies showing that food ingestion involves *de novo* synthesis of GLUT5 mRNA and protein (32). However, the levels of mRNA did not parallel the level of protein except for the refeeding period following the phase III fast, suggesting that regulation of GLUT5 is at least partly post-transcriptional. It must be noticed that the rapid increase in GLUT5 protein amount following refeeding allows intestinal absorption of dietary fructose.

The protein and gene expressions of the facilitative glucose transporter GLUT2 were downregulated during phase II and phase III fasting and upregulated by refeeding. Furthermore, GLUT2 was recruited from the baso-lateral enterocytes membrane to the apical brush border membrane of refed rats. Recruitment of GLUT2 to the apical membrane has been reported in previous studies and is partly controlled by the SGLT1-dependent activation of a protein kinase C (6, 33, 34). GLUT2 is characterized by a high K_m and provides a passive component of glucose absorption from the intestinal lumen detectable at high concentrations (7).

During fasting, the concentration of glucose in the intestinal lumen is lower than in the blood. However, the absence of GLUT2 and the upregulation of SGLT1 during phase III may exclude the loss of glucose from the blood through the enterocytes into the intestinal lumen. Immediately after food ingestion following phase III, glucose should be first absorbed through SGLT1. GLUT2 synthesis may be triggered by refeeding and is then rapidly recruited to the brush-border membrane where it permits massive absorption of glucose.

Gluconeogenesis

During the short phase I fasting period, glycogen stores are completely exhausted (16, 17). Glucose is then produced by gluconeogenesis from various precursors coming essentially from adipose tissue lipolysis during phase II (glycerol) and from protein catabolism during phase III. PEPCCK and Glc6Pase mRNA levels and enzymatic activities have been shown to increase in the small intestine in 48h fasted rats and then to reach a plateau after 72h fasting (12, 14, 15). In our study, PEPCCK and Glc6Pase gene expressions, protein levels and activities did not vary during phase II fasting (5 days fasting) compared to normally-fed animals. Plasma levels of ketone bodies, which have been shown to inhibit specific CoA-

dependent enzymes involved in gluconeogenesis in the liver (35-38) are elevated during this fasting phase (16, 39). In phase II fasted rats however, plasma insulin (known to inhibit gluconeogenesis) dropped, whereas plasma corticosterone (known to stimulate gluconeogenesis) was slightly increased. As a whole, these effects would lead to a lack of significant change in intestinal gluconeogenesis after a 5-day fast (phase II). During a phase III fasting period, the strong increase in gluconeogenesis may be a direct consequence of the elevated plasma corticosterone level and the decrease in ketone bodies (16, 39) in relation to the switch in the gluconeogenic precursors from glycerol to amino acids. Glucocorticoids are known to stimulate gluconeogenesis by induction of PEPCK (40) and Glc6Pase (41-43) gene transcription in the liver. Also, corticosterone induced protein catabolism and thereby, the release of gluconeogenic amino acids. Refeeding rapidly induced normalization of gluconeogenesis, despite a low glycemia. This might be explained by the rapid decrease in the level of plasma corticosterone and by the increase in the level of plasma insulin. A decrease in Glc6Pase activity to base-line values has been shown previously in the liver (44) and in the small intestine (14) in rats refed after short fasting periods. Normalization of PEPCK activity is also rapidly achieved in the jejunum in these animals (15).

Finally, the observation of Glc6Pase in the apical part of the enterocytes suggests that this enzyme could also be involved in the transepithelial transport of glucose, as shown previously (45, 46). According to these studies, glucose absorbed through SGLT1 is phosphorylated into glucose-6 phosphate before entering the endoplasmic reticulum where it is hydrolyzed by Glc6Pase to glucose and phosphate. Glucose then re-enters the cytosol and diffuses out of the enterocytes through GLUT2 or is released into the blood stream by a membrane traffic pathway. This latter mechanism could permit glucose secretion into the blood when GLUT2 is absent like in phase II and phase III fasted rats.

In light of all this data, it appears that energy depletion in relation with body fuel uses and gluconeogenic precursors availability increases the ability of the intestine to absorb sugar from its lumen and stimulates intestinal gluconeogenesis. A phase II fast, associated with a high availability of glycerol as gluconeogenic precursor leads to an impaired ability of the small intestine to absorb glucose and to no change in intestinal gluconeogenesis. A phase III fast however, associated with a high availability of amino acids used as gluconeogenic precursors, leads to an increase in the ability of active glucose absorption. Glucose can then, be immediately absorbed at low concentrations at refeeding. At the same time, intestinal gluconeogenesis is increased. In the absence of GLUT2, Glc6Pase could also play a role in glucose transport through the cell and thereby, in its secretion into the blood stream. Finally,

refeeding induces facilitative transport, so that large amounts of fructose and glucose can be transported from the intestinal lumen to the blood stream.

Acknowledgments:

We thank J.N. Freund, C. Domon-Dell and G. Mithieux for helpful discussion, and C. Arbiol for technical help. We are also grateful for G. Mithieux and D.K. Granner for providing us the Glc6Pase and PEPCCK antibodies.

C.H. was recipient of a Nestlé Nutrition grant.

References

1. Fullerton PM, Parsons DS: The absorption of sugars and water from rat intestine *in vivo*. *Quarterly Journal Experimental Physiology* 41:387-397, 1956.
2. Debnam ES, Levin RJ: An experimental method of identifying and quantifying the active transfer electrogenic component from the diffusive component during sugar absorption measured *in vivo*. *J Physiol* 246(1):181-96, 1975.
3. Lostao MP, Berjon A, Barber A, Ponz F: On the multiplicity of glucose analogues transport systems in rat intestine. *Rev Esp Fisiol* 47(4):209-16, 1991.
4. Rand EB, Depaoli AM, Davidson NO, Bell GI, Burant CF: Sequence, tissue distribution, and functional characterization of the rat fructose transporter GLUT5. *Am J Physiol* 264(6 Pt 1):G1169-76, 1993.
5. Thorens B, Cheng ZQ, Brown D, Lodish HF: Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am J Physiol* 259(6 Pt 1):C279-85, 1990.
6. Kellett GL, Helliwell PA: The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem J* 15(350 Pt 1):155-62, 2000.
7. Kellett GL: The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J Physiol* 15(531 Pt 3):585-95, 2001.
8. Ferraris RP, Villenas SA, Hirayama BA, Diamond J: Effect of diet on glucose transporter site density along the intestinal crypt-villus axis. *Am J Physiol* 262(6 Pt 1):G1060-8, 1992.
9. Cheeseman CI, Maenz DD: Rapid regulation of D-glucose transport in basolateral membrane of rat jejunum. *Am J Physiol* 256(5 Pt 1):G878-83, 1989.
10. Debnam ES, Levin RJ: Effects of fasting and semistarvation on the kinetics of active and passive sugar absorption across the small intestine *in vivo*. *J Physiol* 252(3):681-700, 1975.
11. Das S, Yadav RK, Nagchoudhuri J: Effect of fasting on the intestinal absorption of D-glucose and D-xylose in rats *in vivo*. *Indian J Physiol Pharmacol* 45(4):451-6, 2001.
12. Mithieux G, Bady I, Gautier A, Croset M, Rajas F, Zitoun C: Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(3):E370-5, 2004.

13. Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, Mithieux G: Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes* 50(4):740-6, 2001.
14. Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G: The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology* 117(1):132-9, 1999.
15. Rajas F, Croset M, Zitoun C, Montano S, Mithieux G: Induction of PEPCCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes* 49(7):1165-8, 2000.
16. Goodman MN, Larsen PR, Kaplan MN, Aoki TT, Young VR, Ruderman NB: Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. *Am J Physiol* 239:E277-E286, 1980.
17. Le Maho Y, Vu Van Kha H, Koubi H, Dewasmes G, Girard J, Ferre P, Cagnard M: Body composition, energy expenditure, and plasma metabolites in long-term fasting geese. *Am J Physiol* 41:E342-E354, 1981.
18. Koubi HE, Robin JP, Dewasmes G, Le Maho Y, Frutoso J, Minaire Y: Fasting-induced rise in locomotor activity in rats coincides with increased protein utilization. *Physiol Behav* 50:337-343, 1991.
19. Challet E, le Maho Y, Robin JP, Malan A, Cherel Y: Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* 50(3):405-12, 1995.
20. Jomain-Baum M, Schramm VL: Kinetic mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) from rat liver cytosol. Product inhibition, isotope exchange at equilibrium, and partial reactions. *J Biol Chem* 253(10):3648-59, 1978.
21. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9, 1987.
22. Trayhurn P, Thomas ME, Duncan JS, Black D, Beattie JH, Rayner DV: Ultra-rapid detection of mRNAs on northern blots with digoxigenin-labelled oligonucleotides and 'CDP-Star', a new chemiluminescence substrate. *Biochem Soc Trans* 23(3):494S, 1995.
23. McCartney S, Cramb G: Effects of a high-salt diet on hepatic atrial natriuretic peptide receptor expression in Dahl salt-resistant and salt-sensitive rats. *J Hypertens* 11(3):253-62, 1993.
24. Hames BD: One dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, second edition (ed. B. D. Hames and D. Rickwood) 1996, p. 1-147. Oxford, UK: Oxford University Press.

25. Batt RM, Peters TJ: Effects of prednisolone on the small intestinal mucosa of the rat. *Clin Sci Mol Med* 50(6):511-23, 1976.
26. Batt RM, Scott J: Response of the small intestinal mucosa to oral glucocorticoids. *Scand J Gastroenterol* 74:75-88, 1982.
27. Iannoli P, Miller JH, Ryan CK, Sax HC: Glucocorticoids upregulate intestinal nutrient transport in a time-dependent and substrate-specific fashion. *J Gastrointest Surg* 2(5):449-57, 1998.
28. Sundaram U, Coon S, Wisel S, West AB: Corticosteroids reverse the inhibition of Na-glucose cotransport in the chronically inflamed rabbit ileum. *Am J Physiol* 276(1 Pt 1):G211-8, 1999.
29. Worthington BS, Boatman ES, Kenny GE: Intestinal absorption of intact proteins in normal and protein-deficient rats. *Am J Clin Nutr.* 1974 Mar;27(3):276-86.
30. Welsh FK, Farmery SM, MacLennan K, Sheridan MB, Barclay GR, Guillou PJ, Reynolds JV: Gut barrier function in malnourished patients. *Gut.* 1998 Mar;42(3):396-401.
31. Boza JJ, Moennoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsche R, Donnet A, Schiffrin EJ, Perruisseau G, Balleve O: Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr.* 1999 Jul;129(7):1340-6.
32. Ferraris RP: Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J* 1(360 Pt 2):265-76, 2001.
33. Helliwell PA, Richardson M, Affleck J, Kellett GL: Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. *Biochem J* 15(350 Pt 1):149-54, 2000.
34. Helliwell PA, Richardson M, Affleck J, Kellett GL: Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. *Biochem J* 15(350 Pt 1):163-9, 2000.
35. Balasse E, Couturier E, Franckson JR: Influence of sodium beta-hydroxybutyrate on glucose and free fatty acid metabolism in normal dogs. *Diabetologia* 3(6):488-93, 1967.
36. Shaw JH, Wolfe RR: Influence of beta-hydroxybutyrate infusion on glucose and free fatty acid metabolism in dogs. *Am J Physiol* 247(6 Pt 1):E756-64, 1984.

37. Fery F, Plat L, Melot C, Balasse EO: Role of fat-derived substrates in the regulation of gluconeogenesis during fasting. *Am J Physiol* 270(5 Pt 1):E822-30, 1996.
38. Kean EA, Pogson CI: Inhibition of gluconeogenesis in isolated rat liver cells by methylenecyclopropylpyruvate (ketohypoglycin). *Biochem J* 15;182(3):789-96, 1979.
39. Belkhou R, Cherel Y, Heitz A, Robin JP, Le Maho Y: Energy contribution of protein and lipids during prolonged fasting in the rat. *Nutrition Research* 11:365-374, 1991.
40. Friedman JE, Yun JS, Patel YM, McGrane MM, Hanson RW: Glucocorticoids regulate the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *J Biol Chem* 15;268(17):12952-7, 1993.
41. Ashmore J, Hastings AB, Nesbett FB, Renold AE: Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. VI. Hormonal factors influencing glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem* 218(1):77-88, 1956.
42. Nordlie RC, Arion WJ, Glende EA Jr: Liver microsomal glucose 6-phosphatase, inorganic pyrophosphatase, and pyrophosphate-glucose phosphotransferase. IV. Effects of adrenalectomy and cortisone administration on activities assayed in the absence and presence of deoxycholate. *J Biol Chem* 240(9):3479-84, 1965.
43. Voice MW, Webster AP, Burchell A: The in vivo regulation of liver and kidney glucose-6-phosphatase by dexamethasone. *Horm Metab Res* 29(3):97-100, 1997.
44. Newgard CB, Foster DW, McGarry JD: Evidence for suppression of hepatic glucose-6-phosphatase with carbohydrate feeding. *Diabetes* 33(2):192-5, 1984.
45. Stumpel F, Burcelin R, Jungermann K, Thorens B: Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25;98(20):11330-5, 2001.
46. Santer R, Hillebrand G, Steinmann B, Schaub J: Intestinal glucose transport: evidence for a membrane traffic-based pathway in humans. *Gastroenterology* 124(1):34-9, 2003.

Table I

Plasma corticosterone, urea, insulin and glucose concentrations in control, fasted and refed rats

	<i>Corticosterone</i> 10^{-7}g.L^{-1}	<i>Urea</i> g.L^{-1}	<i>Insulin</i> 10^{-6}g.L^{-1}	<i>Glucose</i> mM
Ctrl	0.83 ± 0.61^a	0.189 ± 0.007^a	3.20 ± 0.46^a	11.42 ± 0.73^a
P2r0	10.77 ± 3.12^{ab}	0.203 ± 0.011^a	0.20 ± 0.06^b	4.57 ± 0.87^b
P2r2	0.51 ± 0.29^a	0.319 ± 0.025^{ab}	1.20 ± 0.41^{bc}	9.88 ± 0.72^{ac}
P2r6	1.60 ± 0.72^a	0.282 ± 0.014^{ab}	1.31 ± 0.46^{bc}	8.58 ± 0.54^{cd}
P2r24	6.07 ± 2.43^{ab}	0.176 ± 0.015^a	1.84 ± 0.31^c	9.43 ± 0.27^{ad}
P3r0	311.01 ± 62.69^b	0.708 ± 0.068^b	0.34 ± 0.11^b	2.57 ± 0.31^b
P3r2	7.08 ± 1.75^{ab}	0.598 ± 0.067^b	0.39 ± 0.13^b	3.59 ± 0.27^b
P3r6	14.67 ± 5.23^{ab}	0.448 ± 0.009^{ab}	1.33 ± 0.29^{bc}	4.22 ± 0.39^b
P3r24	6.78 ± 3.84^{ab}	0.243 ± 0.017^{ab}	1.51 ± 0.26^{bc}	7.51 ± 0.68^d

Results are means \pm SEM, n=6 rats per group. Within the same column, values with different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table II:

In vivo glucose uptake measurements and glycemia after 5mM intestinal glucose perfusion in control, phase II and phase III fasted rats

	Ctrl	P2r0	P3r0
Glucose absorption (5mM perfusate) ($10^{-4} \text{mmol glucose/mg mucosa/min}$)	3.03 ± 0.23^a	3.91 ± 0.51^b	6.29 ± 0.56^c
Glycemia mM (not perfused)	11.42 ± 0.73^a	4.57 ± 0.87^c	2.57 ± 0.31^c
Glycemia mM (5mM perfusate)	14.33 ± 2.46^b	9.24 ± 0.97^d	6.27 ± 1.21^d

Results are means \pm SEM, n=5 rats per group. Values with different letters are significantly different ($P < 0.05$). Glucose absorption was compared according to the metabolic status (Ctrl, P2r0, P3r0). Glycemia was compared according to the metabolic status (Ctrl, P2r0, P3r0) and to the perfusion condition (none, 5mM perfusate).

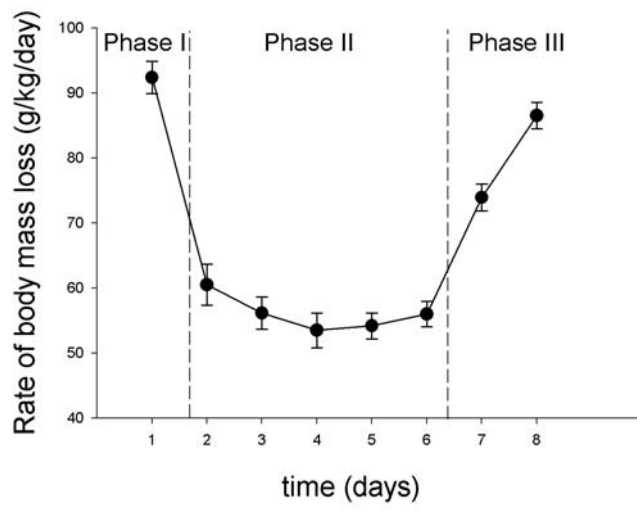


Figure 1: Rate of body mass loss (dM/Mdt, g/kg/day) in fasted rats. Mean \pm SEM (n=5).

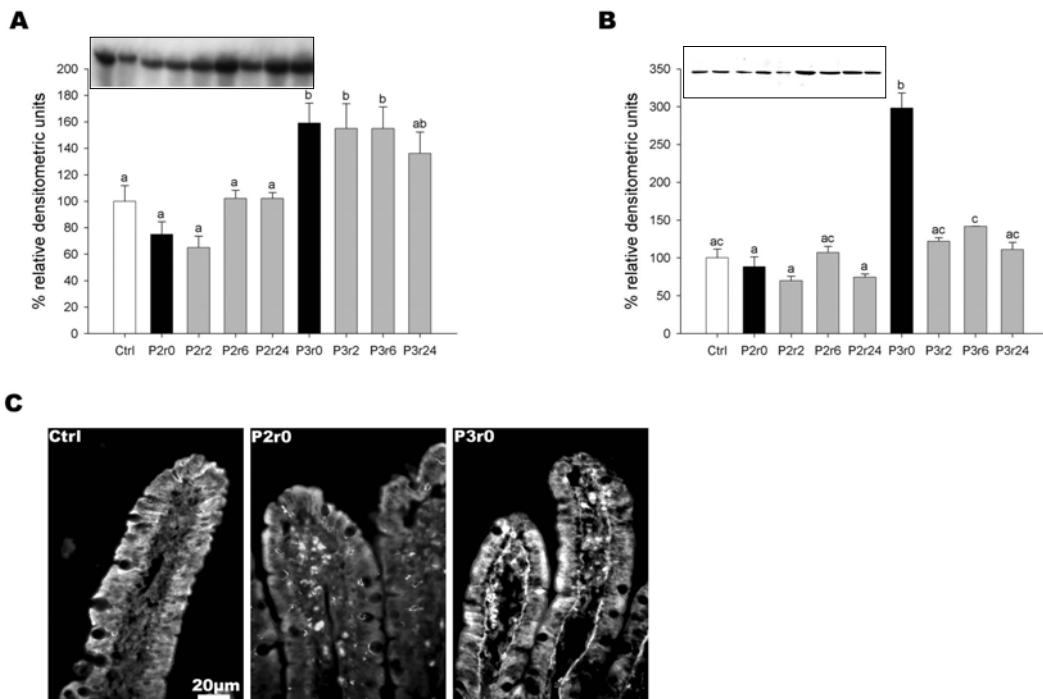


Figure 2: SGLT1 gene (A) and protein (B) expressions in Ctrl, P2r0 and P3r0 rats and after refeeding (P2r2, P2r6, P2r24, P3r2, P3r6, P3r24). The upper panels show representative northern (A) and western (B) blots and the lower panels show the densitometric analysis (Ctrl to P3r24 from the left to the right). (C) shows SGLT1 immunolocalization in control, phase II and phase III fasted rats. The immunofluorescence in the *lamina propria* is non-specific. Mean \pm SEM (n=5 per group).

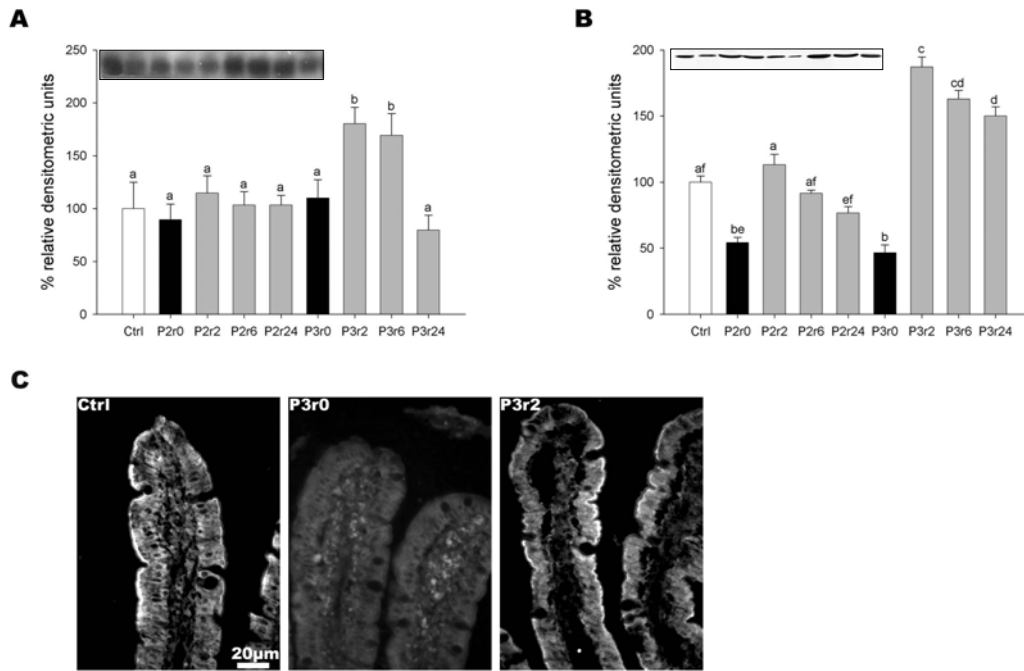


Figure 3: GLUT5 gene (A) and protein (B) expressions in Ctrl, P2r0 and P3r0 rats and after refeeding (P2r2, P2r6, P2r24, P3r2, P3r6, P3r24) and GLUT5 immunolocalization (C) in control, phase III fasted and 2h refed rats following phase III. Mean \pm SEM (n=5 per group).

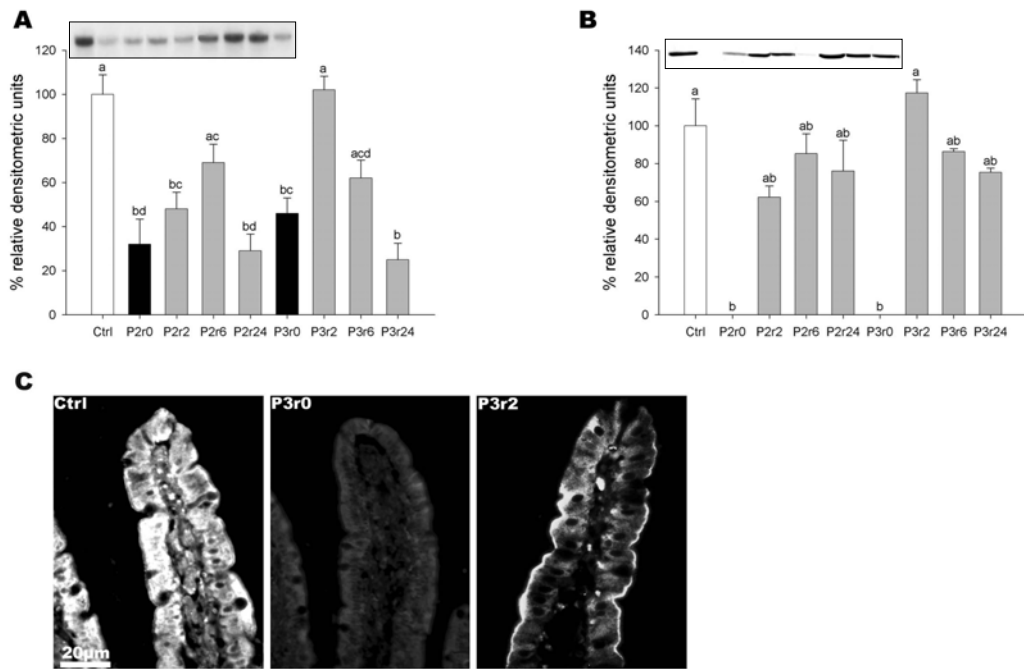


Figure 4: GLUT2 gene (A) and protein (B) expressions in Ctrl, P2r0 and P3r0 rats and after refeeding (P2r2, P2r6, P2r24, P3r2, P3r6, P3r24) and GLUT2 immunolocalization (C) in control, phase III fasted and 2h refed rats following phase III. Mean \pm SEM (n=5 per group).

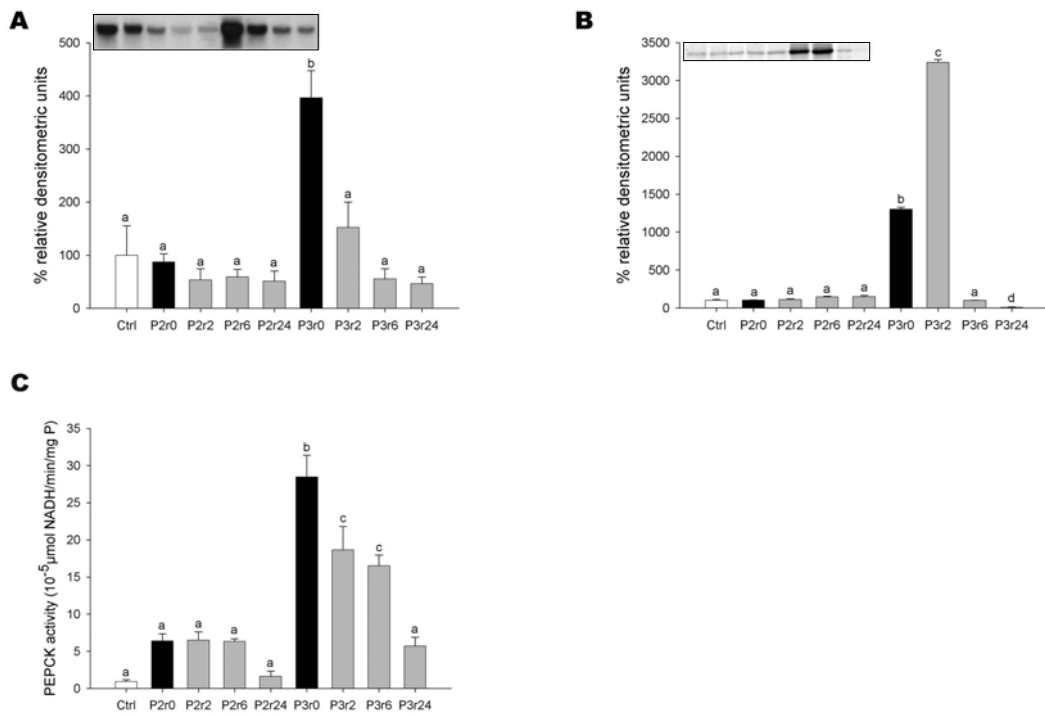


Figure 5: PEPCCK gene expression (A), protein level (B) and activity (C) in Ctrl, P2r0 and P3r0 rats and after refeeding (P2r2, P2r6, P2r24, P3r2, P3r6, P3r24). Mean +/- SEM (n=5 per group).

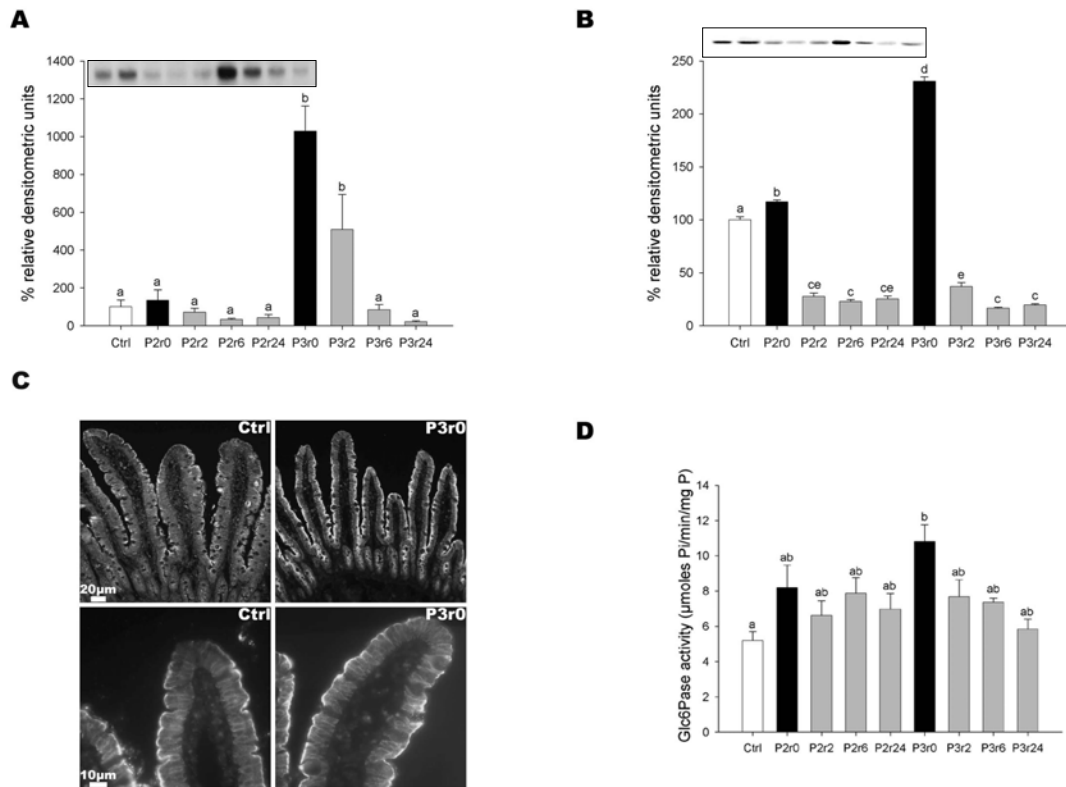


Figure 6: Glc6Pase gene expression (A), protein level (B) and activity (D) in Ctrl, P2r0 and P3r0 rats and after refeeding (P2r2, P2r6, P2r24, P3r2, P3r6, P3r24). (C) shows Glc6Pase immunolocalization in control and phase III fasted rats. Mean \pm SEM (n=5 per group).

3. Résultats – Discussion

Cette étude a montré une augmentation du niveau de l'expression génique et de la quantité de protéine SGLT1 en phase III mais pas en phase II de jeûne. Pourtant, l'absorption intestinale de glucose augmente en phase II et en phase III du jeûne. Un second mécanisme interviendrait par conséquent dans l'absorption intestinale de glucose chez les rats à jeûn. Il s'agirait d'un passage paracellulaire de glucose lié à l'augmentation de la perméabilité épithéliale au cours du jeûne.

Les glucocorticoïdes stimulent l'absorption intestinale des sucres (Batt & Peters, 1976 ; Batt & Scott, 1982 ; Iannoli *et al.*, 1998) et la néoglucogénèse (Ashmore *et al.*, 1956 ; Nordlie *et al.*, 1965 ; Friedman *et al.*, 1993 ; Voice *et al.*, 1997). Par contre, l'insuline inhibe la néoglucogénèse et les acides gras libres et les corps cétoniques suppriment l'activité néoglucogénique hépatique (Balasse *et al.*, 1967 ; Shaw & Wolfe, 1984 ; Fery *et al.*, 1996). Pendant la phase II du jeûne, les taux plasmatiques d'acides gras libres et de corps cétoniques augmentent. Dans l'intestin grêle, toutefois, les niveaux de l'expression génique, les quantités et les activités des protéines PEPCK et Glc6Pase sont maintenus à des valeurs basales, probablement en raison d'une baisse brutale de l'insulinémie et d'une légère augmentation de la corticostéronémie. En phase III de jeûne, l'augmentation de SGLT1 et des enzymes néoglucogéniques pourrait être induite par l'élévation importante de la corticostéronémie. L'activité néoglucogénique intestinale serait alors également stimulée par la baisse des concentrations plasmatiques des acides gras libres et des corps cétoniques.

La localisation de la Glc6Pase sous la membrane apicale des entérocytes chez les rats en phase III de jeûne suggère que cette enzyme pourrait également jouer un rôle dans le transport intracellulaire de glucose mis en évidence par Stümpel *et al.* (2001) et Santer *et al.* (2003). Ce transport intracellulaire permettrait la libération du glucose dans le sang au pôle baso-latéral de la cellule, en l'absence de GLUT2 c'est-à-dire en phase II et en phase III du jeûne. En effet, notre étude montre que la glycémie augmente à la fin des vingt minutes de perfusion intestinale de glucose.

La réalimentation consécutive à une phase III de jeûne entraîne une baisse rapide de la quantité de protéines mais pas de l'ARNm de SGLT1, ce qui suggère un contrôle post-transcriptionnel de ce transporteur chez les rats après réalimentation. Par contre, la réalimentation stimule la synthèse des transporteurs GLUT2 et GLUT5, ce qui suggère

qu'elle agit au niveau transcriptionnel. Chez les animaux réalimentés, GLUT2 est recruté au pôle apical des entérocytes par un mécanisme dépendant de SGLT1. L'absorption de glucose serait donc beaucoup plus importante chez les rats réalimentés que chez les rats contrôles, sans doute en vue de compenser les pertes énergétiques subies au cours du jeûne.

La baisse de la corticostéronémie et l'augmentation de l'insulinémie chez les rats réalimentés après un jeûne de phase III entraînent une diminution rapide de la néoglucogenèse dans l'intestin grêle.

4. Résultats complémentaires à cet article

4.1. Introduction

Nous avons mesuré les activités enzymatiques de la sucrase-isomaltase et de la lactase dans le jéjunum des rats contrôles, en phase II et III de jeûne, puis après 2h, 6h et 24h de réalimentation après chaque phase. La sucrase-isomaltase est une molécule hybride constituée de deux enzymes, l'une hydrolysant le sucrose en glucose et fructose, et l'autre les points de ramification α -1, 6 des α -dextrines résiduelles. La lactase catalyse l'hydrolyse du lactose en glucose et en galactose.

Chez les mammifères, la lactase est exprimée dès la naissance dans la bordure en brosse des entérocytes. Son expression génique diminue lors du sevrage tandis que celle de la sucrase-isomaltase augmente (Wang *et al.*, 1998). Ces changements sont sous le contrôle des hormones thyroïdiennes et des glucocorticoïdes (cf. **Revue Bibliographique 2.3.6.1.3.**).

Le niveau de l'expression génique et l'activité de ces deux enzymes sont également régulés par la prise alimentaire. Une alimentation enrichie en sucrose ou en fructose entraîne une augmentation de la quantité d'ARNm de la sucrase-isomaltase et de la lactase (Goda, 2000). La transcription de ces deux gènes serait activée par la liaison de Cdx2 sur leurs promoteurs respectifs situés en amont de la séquence à transcrire (Goda, 2000). Par contre, l'activité de la sucrase-isomaltase diminue au cours du jeûne (Ihara *et al.*, 2000a), tandis que l'activité de la lactase augmente pendant les premiers jours du jeûne puis diminue également (Raul *et al.*, 1982).

4.2. Méthodes

Les activités de la sucrase-isomaltase et de la lactase ont été mesurées dans des échantillons de la membrane de la bordure en brosse préalablement isolés à partir de la muqueuse totale en utilisant la méthode de Schmitz *et al.* (1973). La mesure de l'activité a consisté à incuber à 37°C les fractions membranaires contenant les deux enzymes avec leurs substrats respectifs, saccharose et lactose, puis à doser par méthode colorimétrique le glucose produit. Les activités enzymatiques ont été exprimées en milliunités par milligrammes de protéines (une unité hydrolyse une micromole de substrat par minute à 37°C). Les protéines ont été dosées par la méthode de l'acide bicinchoninique.

4.3. Résultats et discussion

L'activité de la sucrase-isomaltase diminue pendant la phase II du jeûne, mais de manière non significative par rapport au contrôle (**figure 19**). En phase III de jeûne par contre, l'activité de la sucrase-isomaltase est significativement inférieure à celle mesurée chez des animaux contrôles. Elle est normalisée après 6h de réalimentation.

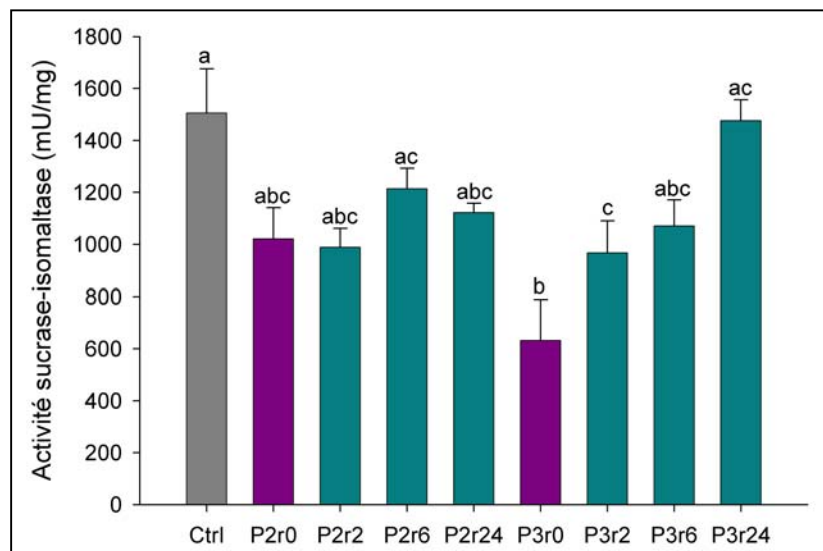


Figure 19. Activité de la sucrase-isomaltase dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0, P2r2, P2r6, P2r24, P3r0, P3r2, P3r6, P3r24. Chaque barre représente la moyenne \pm SEM de 5 rats.

L'activité de la lactase augmente au cours des phases II et III du jeûne, puis diminue dès 2h de réalimentation (**figure 20**).

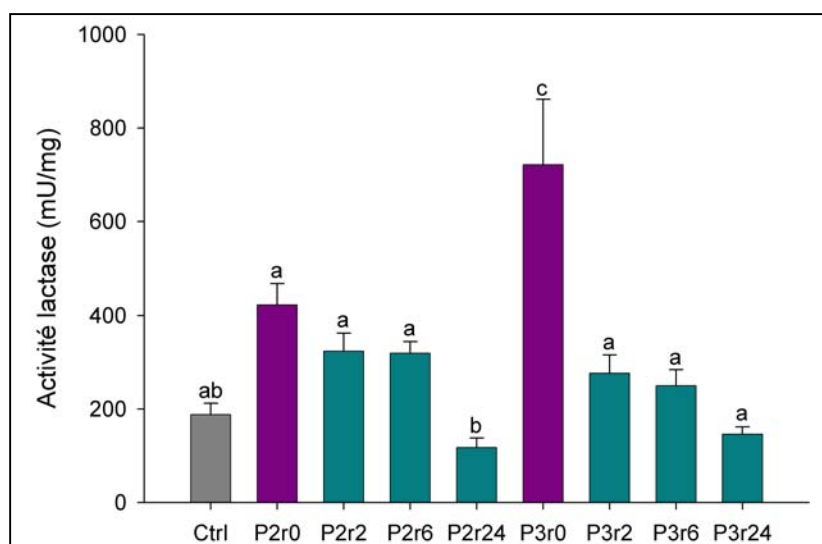


Figure 20. Activité de la lactase dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0, P2r2, P2r6, P2r24, P3r0, P3r2, P3r6, P3r24. Chaque barre représente la moyenne \pm SEM de 5 rats.

Ces résultats confirment ceux de Galluser *et al.* (1991) obtenus chez des rats ayant jeûné pendant 8 (phase II) et 15 jours (phase III). L'étude de ces auteurs montre par ailleurs qu'une thyroïdectomie prévient la diminution de l'activité de la sucrase-isomaltase chez des rats ayant jeûné 15 jours mais pas chez ceux ayant jeûné 8 jours. De plus, la thyroïdectomie renforce les effets stimulateurs du jeûne sur l'activité de la lactase. Les hormones thyroïdiennes auraient donc un effet inhibiteur sur l'activité de la sucrase-isomaltase pendant un jeûne de 15 jours et sur l'activité de la lactase pendant un jeûne de 8 ou de 15 jours. Un autre mécanisme est donc impliqué dans l'augmentation de l'activité de la lactase au cours des phases II et III du jeûne et dans le maintien d'une activité de la sucrase-isomaltase au cours du jeûne de phase III. Comme les glucocorticoïdes stimulent l'absorption intestinale de sucres (Batt & Peters, 1976 ; Batt & Scott, 1982 ; Iannoli *et al.*, 1998), ils pourraient avoir cet effet antagoniste de celui des hormones thyroïdiennes en phase III du jeûne, en stimulant l'activité des oligosaccharidases localisées dans la bordure en brosse des entérocytes.

Résultats complémentaires

1. Introduction

Notre étude des effets du jeûne sur l'absorption intestinale en fonction de l'état métabolique et hormonal des animaux s'est poursuivie par la mesure de la quantité de transporteurs d'acides gras (FATP4) et de peptides (PepT1).

FATP4 permet l'absorption facilitée des acides gras dans l'entérocyte. L'absorption intestinale des acides gras est stimulée par l'administration orale de glucocorticoïdes (Thiesen *et al.*, 2002) ou dans le cas d'une alimentation enrichie en acides gras saturés (Thomson *et al.*, 1986) (cf. **Revue Bibliographique 2.3.6.**). Les mécanismes régulant la transcription et la synthèse protéique de FATP4 sont peu connus. Par ailleurs, seule l'étude de Besnard *et al.* (1991) a porté sur les effets du jeûne sur l'absorption intestinale des lipides et montre une augmentation de l'expression génique des FABPs chez des rats soumis à un jeûne de trois jours. Nous avons mesuré, par la technique de western blot (décrite dans les articles 3 et 4), la quantité de protéine FATP4 chez des rats nourris, ayant subi un jeûne de phase II ou III puis réalimentés suite au jeûne. Nous avons également réalisé un marquage immunofluorescent de cette protéine (technique également décrite dans les articles 3 et 4). L'anticorps utilisé nous a été offert par le Dr. A. Stahl (Whitehead Institute for Biomedical Research, 9 Cambridge Center, Massachusetts 02142, USA).

Les di- et tripeptides sont transportés contre le gradient de concentration par le cotransporteur peptides / protons PepT1 (Ogihara *et al.*, 1996). Une alimentation enrichie en protéines stimule la transcription du gène codant pour PepT1 (Erickson *et al.*, 1995) (cf. **Revue Bibliographique 2.3.6.**). La leptine stimule la synthèse de la protéine PepT1 (Buyse *et al.*, 2001) et l'insuline induit son recrutement dans la bordure en brosse à partir de son lieu de stockage cytoplasmique (Thamotharan *et al.*, 1999a). Par contre, l'hormone thyroïdienne T3 inhibe la transcription et la synthèse de la protéine PepT1 (Ashida *et al.*, 2001). Un jeûne de quelques jours entraîne une augmentation du niveau de l'expression du gène et de la quantité de la protéine PepT1 (Ogihara *et al.*, 1999 ; Thamotharan *et al.*, 1999b ; Ihara *et al.*, 2000b). Nous avons mesuré la quantité (par western blot) et réalisé un marquage immunofluorescent de la protéine PepT1, grâce à un anticorps qui nous a été offert par le Dr. D. E. Smith (University of Michigan, Ann Arbor Michigan 48109, USA).

2. Résultats et discussion

2.1. Effets du jeûne et de la réalimentation sur la quantité de protéine FATP4

La quantité de protéine FATP4 diminue significativement chez des rats en phase II du jeûne par rapport à la quantité mesurée chez des animaux contrôles (**figure 21**). Elle augmente après réalimentation et atteint une valeur supérieure, bien que statistiquement non différente de la valeur contrôle après 6h et 24h. En phase III du jeûne, la quantité de protéine FATP4 est significativement inférieure à celle des rats contrôles et en phase II du jeûne. Elle augmente cependant très vite après réalimentation et atteint la valeur contrôle dès 2h.

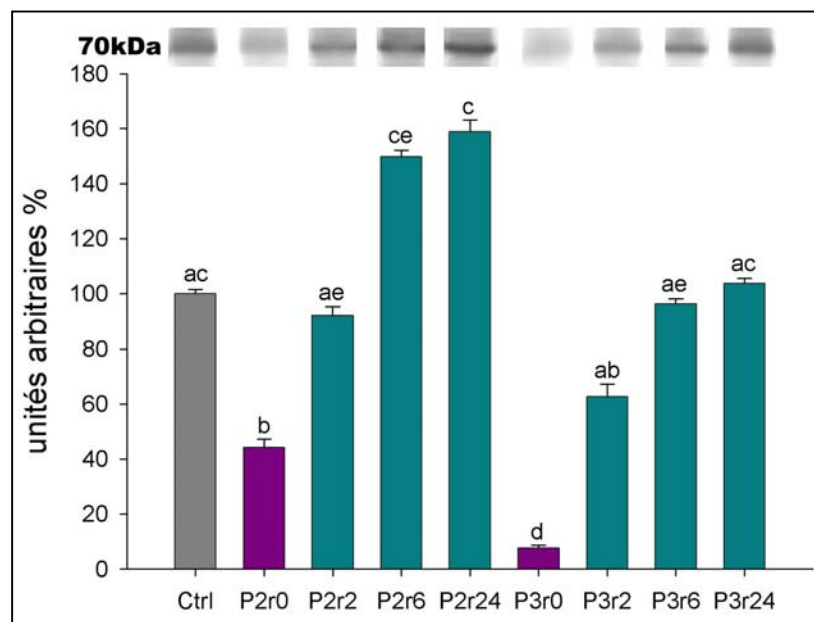


Figure 21. Quantité de protéine FATP4 dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0, P2r2, P2r6, P2r24, P3r0, P3r2, P3r6, P3r24. Chaque barre représente la moyenne \pm SEM de 5 rats.

FATP4 est localisée dans la membrane apicale des entérocytes sur toute la hauteur des villosités chez les rats contrôles, mais semble être présente en quantité plus importante en leur sommet (**figure 22**). Le marquage est très faible chez des rats à jeun. Après réalimentation, FATP4 est à nouveau visible sur toute la hauteur de la villosité, de manière uniforme. Le marquage est très intense chez des rats réalimentés 6h et 24h après la phase II du jeûne.

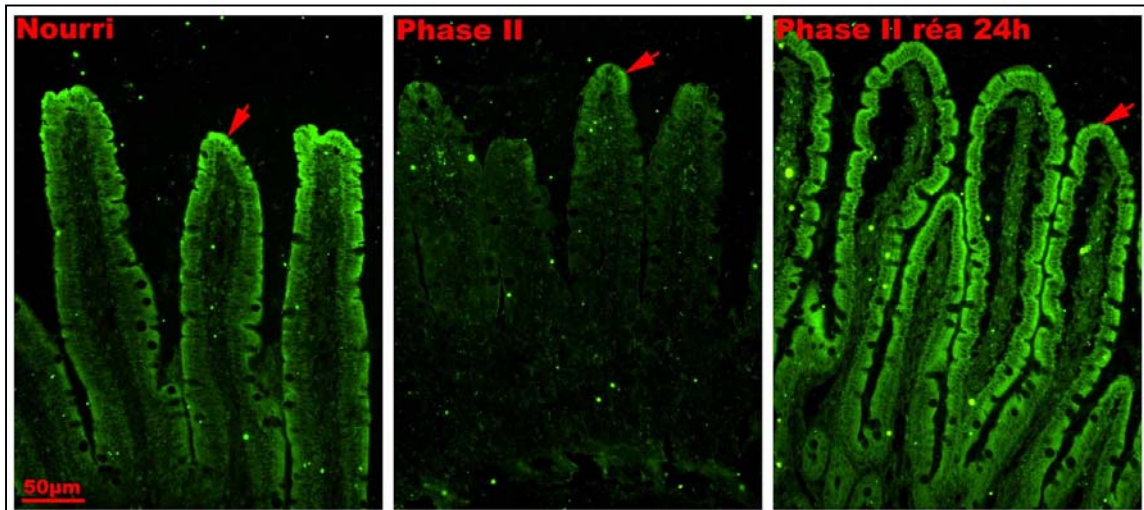


Figure 22. Immunolocalisation de la protéine FATP4 dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0 et P2r24

Ces résultats suggèrent par conséquent que le jeûne inhiberait la synthèse de la protéine FATP4, en particulier chez des rats en phase III du jeûne. Besnard *et al.* (1991) ont montré que le jeûne entraîne une augmentation du niveau de l'expression des gènes codant pour les FABPs. Cependant, FATP4 et les FABPs agissent généralement conjointement pour permettre l'absorption des acides gras, FATP4 en permettant leur passage transmembranaire et les FABPs en évitant leur efflux du cytoplasme de l'entérocyte dans la lumière intestinale (cf. **Revue Bibliographique 2.3.5.**). En fait, les différences entre les deux études pourraient s'expliquer par un effet du jeûne qui stimulerait la transcription et / ou inhiberait la synthèse des protéines impliquées dans l'absorption des acides gras. Pour tester cette hypothèse, nous envisageons de mesurer le niveau de l'expression génique de FATP4 et de déterminer la quantité des protéines FABPs au cours du jeûne. Il serait par ailleurs intéressant d'étudier la protéine CD36 qui joue un rôle analogue à celui de FATP4 et qui pourrait être régulée de manière différente au cours du jeûne.

Ces travaux montrent également que la réalimentation induit une rapide augmentation de la quantité de protéine FATP4 chez des rats en phase II et en phase III de jeûne permettant une absorption d'acides gras et donc de combler le déficit énergétique subi au cours du jeûne. L'étude de Thouzeau *et al.* (1995) montre que des rats en phase II et en phase III du jeûne pouvant choisir entre trois types de réalimentation (enrichie en glucides, en protéines ou en lipides) ingèrent préférentiellement des lipides et sont en outre hyperphagiques. A partir du troisième jour de réalimentation, les rats ayant jeûné jusqu'en phase III ingèrent davantage de lipides que ceux en phase II (Thouzeau *et al.*, 1995). Au vu de ces résultats, il serait intéressant de rechercher si l'augmentation de la quantité de protéine FATP4 se poursuit au-

delà de 24h de réalimentation chez nos rats en fonction du seuil de déplétion des réserves lipidiques atteint au moment de la réalimentation.

Les rats ayant jeûné jusqu'en phase III nécessitent en outre un apport azoté important afin de restaurer les protéines corporelles. Ces rats ingèrent en effet davantage de protéines que des rats en phase II (Thouzeau *et al.*, 1995).

2.2. Effets du jeûne sur la quantité de protéine PepT1

Par rapport aux animaux nourris, la protéine PepT1 est présente en quantités 34 et 55 fois supérieures chez des rats en phase II et III du jeûne, respectivement (**figure 23**).

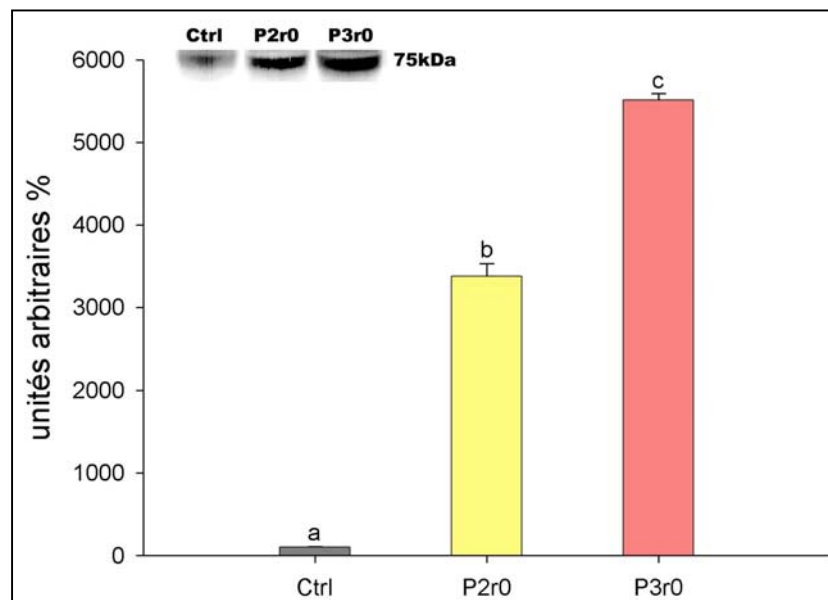


Figure 23. Quantité de protéine PepT1 dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0 et P3r0. Chaque barre représente la moyenne \pm SEM de 5 rats.

PepT1 est localisée dans la membrane apicale des entérocytes chez des rats contrôles, en phase II et en phase III du jeûne (**figure 24**). Elle est surtout présente dans le tiers supérieur des villosités chez les rats contrôles et en phase II du jeûne, alors qu'elle est localisée sur toute la hauteur de la villosité chez des rats en phase III du jeûne. Chez certains rats, contrôles ou à jeun, un marquage supranucléaire a également été observé (photo du bas à droite).

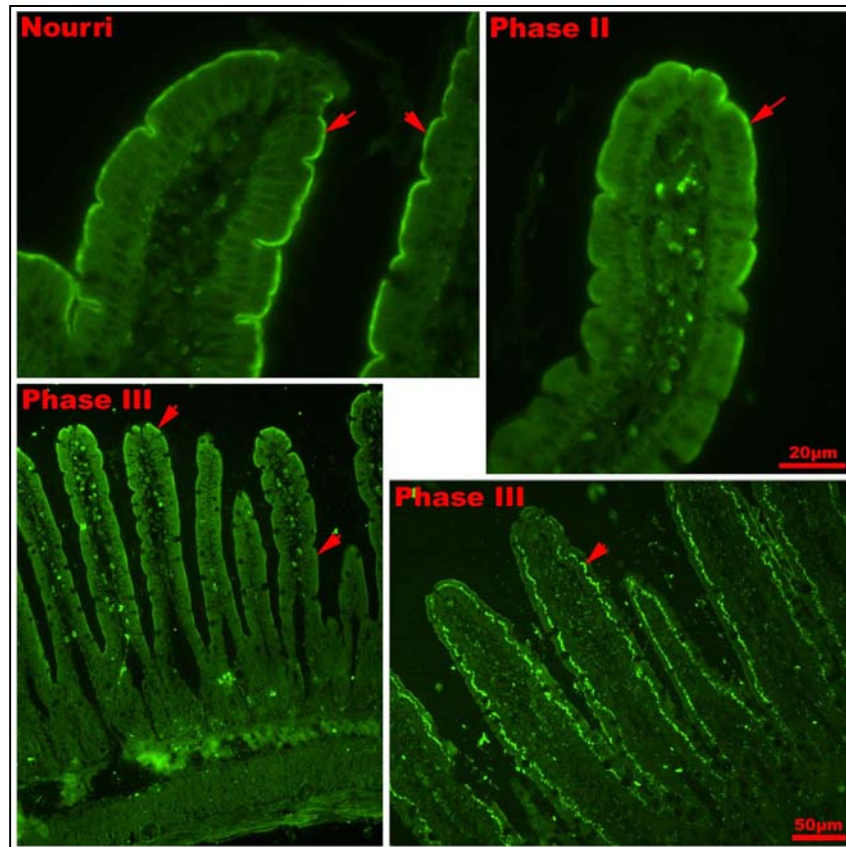


Figure 24. Immunolocalisation de la protéine PepT1 dans le jéjunum de rats Ctrl, P2r0 et P3r0

L'augmentation de la quantité de protéine PepT1 au cours du jeûne est en accord avec les études antérieures (Ogihara *et al.*, 1999 ; Thamocharan *et al.*, 1999b ; Ihara *et al.*, 2000b).

La présence de PepT1 en grande quantité en phase III du jeûne devrait permettre une absorption massive de peptides, et par conséquent d'azote, dès que l'alimentation est restaurée. Les rats reconstitueraient ainsi rapidement leurs protéines corporelles.

La leptine et l'insuline stimulent la synthèse de PepT1 et son recrutement dans la bordure en brosse des entérocytes (Buyse *et al.*, 2001 ; Thamocharan *et al.*, 1999a). L'augmentation de PepT1 en phase III du jeûne n'est donc pas cohérente avec la diminution de la leptinémie (Bertile *et al.*, en préparation) et de l'insulinémie. Il serait donc intéressant de rechercher quels sont les mécanismes induisant cette augmentation et en premier lieu d'étudier les effets de la corticostérone sur l'expression génique et la synthèse de PepT1. Une étude montre en effet que la dexaméthasone entraîne une légère augmentation du niveau de l'expression génique de PepT1 (Shu *et al.*, 2002).

L'observation de PepT1 au niveau supranucléaire, dans ce qui est probablement son lieu de stockage cytoplasmique, est indépendante de l'état nutritionnel des animaux (nourris

ou à jeun) et témoigne d'une synchronisation de la synthèse et du recrutement apical de la protéine entre tous les entérocytes d'une villosité et entre toutes les villosités d'un animal.

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion générale

Malgré une importante atrophie de la muqueuse de l'intestin grêle au cours du jeûne chez le rat (Dunel-Erb *et al.*, 2001 ; **Articles 1 et 2**), la réalimentation des animaux est efficace et permet une restauration très rapide de leur condition corporelle, ce quels que soient la durée du jeûne et / ou l'état de leurs réserves corporelles (Bjorntorp *et al.*, 1982 ; Decrock *et al.*, 1998). Des mécanismes cellulaires et moléculaires permettant l'absorption intestinale sont en effet préservés lorsque le jeûne se prolonge voire même stimulés quand l'animal atteint un seuil critique de déplétion de ses réserves énergétiques caractérisant la phase III. Dans cette étude, nous avons en effet pu mettre en évidence l'augmentation de la réplication de l'ADN et des divisions cellulaires dans les cryptes intestinales, ainsi qu'une accélération de la migration des cellules des cryptes dans les villosités, au cours de la phase III du jeûne chez le rat, c'est-à-dire alors que les réserves lipidiques de l'animal sont épuisées à plus de 80% et que les protéines structurales sont peu à peu catabolisées (**Article 2**). Cette prolifération cellulaire accrue s'accompagne de l'arrêt de l'apoptose au sommet des villosités intestinales, ce qui assure la préservation des entérocytes différenciés. Par contre, au cours de la phase II du jeûne, phase d'épargne protéique, la prolifération cellulaire est réduite, tandis que l'apoptose au sommet des villosités intestinales est maintenue.

Pendant la phase III, c'est-à-dire après 10 à 12 jours de jeûne en moyenne, les mécanismes cellulaires de l'épithélium intestinal concourent donc à la préparation de la muqueuse intestinale à la réalimentation et coïncident avec ce qui est interprété comme un comportement de recherche alimentaire de l'animal induit par une corticostéronémie élevée (Challet *et al.*, 1995). En outre, nous avons montré l'implication de la diminution des cytokines TGF β 1 et TNF α et du facteur de transcription intestinal Cdx2 dans l'arrêt de l'apoptose intestinale et la reprise de la prolifération cellulaire en phase III (**Article 3**). Ceci suggère un contrôle de TGF β 1, TNF α et Cdx2 par la corticostérone, hypothèse qu'il faudra vérifier par des expériences complémentaires.

Outre le maintien des cellules absorbantes au sommet des villosités intestinales en phase III du jeûne, nous avons mesuré une augmentation des transporteurs apicaux PepT1 et SGLT1 et du transport de glucose aux pôles apical et baso-latéral des entérocytes (**Résultats complémentaires, article 4**). L'absorption de peptides *via* PepT1 dès réalimentation représente un apport azoté indispensable à la reconstitution des protéines corporelles chez des rats ayant subi un jeûne de phase III. L'absorption de glucose au cours des phases II et III du

jeûne est réalisée *via* SGLT1 et par voie paracellulaire. Les mécanismes permettant la libération du glucose dans le sang au niveau du pôle baso-latéral des entérocytes, en l'absence de GLUT2, ne sont pas clairement identifiés mais ils pourraient impliquer la Glc6Pase. Cette enzyme intervient en effet dans le transport intracytoplasmique du glucose à l'intérieur de vésicules microsomales qui fusionneraient avec la membrane baso-latérale pour libérer leur contenu dans la circulation générale (Stümpel *et al.*, 2001 ; Santer *et al.*, 2003). Une absorption rapide de glucose dès restauration de l'alimentation après une phase III de jeûne correspond à l'apport d'un substrat énergétique rapidement assimilable par toutes les cellules de l'organisme.

La Glc6Pase et la PEPCK, deux enzymes néoglucogéniques impliquées dans la synthèse de glucose par l'intestin grêle (Anderson & Rosendall, 1973 ; Rajas *et al.*, 1999 et 2000), augmentent avec la disponibilité en acides aminés glucoformateurs en phase III du jeûne (**Article 4**). Pendant la phase III du jeûne (après 10 à 12 jours de jeûne), mais pas en phase II après 5 jours de jeûne, l'intestin grêle participe donc à la fourniture en glucose aux cellules de l'organisme.

La réalimentation entraîne une restauration rapide de la muqueuse de l'intestin grêle, qui est observable à l'ESEM dès une demi-heure de réalimentation suite à un jeûne de phase II. Cette restauration semble être mécanique tout d'abord, avec une élongation de la *lamina propria* qui entraîne les entérocytes vers le sommet des villosités et provoque par conséquent un accroissement des villosités. L'allongement de la *lamina propria* serait induit par des contractions des fibres musculaires lisses (Moore *et al.*, 1989 ; Blikslager & Roberts, 1997) et / ou par une augmentation de la pression sanguine et lymphatique (Starck & Beese, 2002). Chez ces rats réalimentés consécutivement à une phase II de jeûne, la restauration se poursuit par l'augmentation des divisions cellulaires dans les cryptes de Lieberkühn et s'achève après 3 jours de réalimentation (Dunel-Erb *et al.*, 2001). Chez les animaux en phase III de jeûne, la restauration est initiée déjà pendant le jeûne avec l'augmentation de la prolifération et de la migration cellulaires (**Article 2**). En conséquence, malgré une atrophie évidemment plus importante en phase III, la muqueuse intestinale de ces rats est également complètement restaurée après 3 jours de réalimentation (Dunel-Erb *et al.*, 2001 ; **Articles 1 et 2**).

La réalimentation stimule la synthèse des transporteurs facilités d'hexoses GLUT5 et GLUT2 et le recrutement de GLUT2 dans la membrane apicale des entérocytes. Elle induit ainsi une absorption massive de glucose et de fructose après une phase II et une phase III de jeûne (**Article 4**). La réalimentation consécutive à une phase II et à une phase III de jeûne entraîne

également l'augmentation de la quantité de protéine FATP4 permettant un apport énergétique conséquent avec l'absorption des acides gras (**Résultats complémentaires**).

Tous nos résultats tendent donc à confirmer l'hypothèse d'une phase II peu coûteuse en énergie, caractérisée par une épargne des protéines corporelles et par un arrêt de la prolifération des cellules de l'épithélium intestinal et de la synthèse de transporteurs intestinaux. Au cours de la phase III du jeûne par contre, la prolifération cellulaire est accrue dans l'intestin grêle et la synthèse de certains transporteurs, en particulier des transporteurs actifs possédant une très haute affinité pour leurs substrats, est augmentée. Il y aurait donc une préparation de la muqueuse intestinale à la réalimentation en phase III du jeûne, qui coïnciderait avec le comportement de recherche alimentaire des animaux et permettrait donc l'absorption de nutriments, même à de faibles concentrations, dès leur arrivée dans la lumière intestinale. De plus, la néoglucogenèse intestinale est stimulée pendant cette phase du jeûne, ce qui assure un apport en glucose aux cellules de l'organisme.

2. Perspectives

2.1. Effets des phases ou de la durée du jeûne ?

Bien que l'on puisse conclure à un effet de l'état métabolique et hormonal des animaux sur les mécanismes impliqués dans le renouvellement cellulaire de l'épithélium intestinal (réplication de l'ADN, mitoses, migration cellulaire), sur l'expression de SGLT1 et sur la néoglucogenèse intestinale, d'autres mécanismes varient uniquement avec la durée du jeûne, indépendamment des trois phases (expressions de PepT1 et FATP4, activités de la sucrase-isomaltase et de la lactase). Il serait toutefois intéressant de compléter l'étude avec une nouvelle condition expérimentale, à savoir des rats entrant en phase III après seulement cinq jours de restriction alimentaire totale (ce qui correspond à la durée de jeûne des rats sacrifiés en phase II), ce qui permettrait de distinguer avec certitude les effets des phases de ceux de la durée du jeûne.

2.2. Rôle de la corticostérone ?

Nos travaux, à la lumière des données de la littérature, suggèrent l'implication de l'élévation de la corticostéronémie en phase III du jeûne dans la régulation de certains mécanismes (diminution de l'expression des cytokines et de Cdx2, augmentation de l'expression de SGLT1, augmentation de la néoglucogenèse intestinale). Pour confirmer cette hypothèse, les mesures que nous avons réalisées pourraient être réitérées chez des rats surrénalectomisés puis recevant une injection de corticostérone.

2.3. Etude de l'apoptose

Il serait intéressant de quantifier les phénomènes apoptotiques au sommet des villosités intestinales par des mesures de l'expression génique et de la quantité des protéines impliquées dans ces phénomènes (caspases, produits de clivage des caspases, ...).

2.4. Mesures de l'absorption des protéines et des lipides

Par manque de temps, nous n'avons pu déterminer l'expression génique et la quantité de protéines des transporteurs d'acides aminés, d'acides gras et de cholestérol. De telles études devraient bien sûr être menées, ainsi qu'une mesure *in vivo* de l'absorption de ces nutriments.

2.5. Effets de réalimentations différenciées

Du point de vue biomédical, une connaissance approfondie de l'expression de tous les transporteurs intestinaux en fonction de l'état de déplétion des réserves énergétiques des animaux à jeun devrait permettre le choix d'une réalimentation adaptée, d'éviter ainsi un syndrome de renutrition inappropriée (Crook *et al.*, 2001) et de favoriser par conséquent une restauration rapide de la condition corporelle. Dans cette optique, il serait donc intéressant de comparer les effets de réalimentations isocaloriques enrichies soit en glucides (hexoses ou polysaccharides), soit en protéines, soit en lipides (acides gras saturés ou polyinsaturés) sur l'absorption intestinale et la composition corporelle de rats en phase II et III du jeûne.

Références bibliographiques

A

- Abumrad N., Harmon C., Ibrahimi A. Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *Journal of Lipid Research* 1998, 39: 2309-2318.
- Acra SA, Bulus N, Bogatcheva G, Coffey RJ, Barnard JA. Increased intestinal epithelial proliferation in metallothioneine-transforming growth factor alpha transgenic mice. *Regul Pept.* 1998 Jun 30;74(2-3):105-12.
- Agre P., Sasaki S., Chrispeels M.J. Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am J Physiol* 1993, 265: F461.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature.* 1996 Jul 18;382(6588):250-2.
- Ahima RS. Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Front Horm Res.* 2000;26:42-56.
- Ainsworth MA, Hogan DL, Rapier RC, Amelsberg M, Dreilinger AD, Isenberg JI. Acid/base transporters in human duodenal enterocytes. *Scand J Gastroenterol.* 1998 Oct;33(10):1039-46.
- Altmann GG. Influence of starvation and refeeding on mucosal size and epithelial renewal in the rat small intestine. *Am J Anat* 1972, 133: 391-400.
- Anderson JW, Rosendall AF. Gluconeogenesis in jejunal mucosa of guinea pig. *Biochim Biophys Acta.* 1973 Apr 28;304(2):384-8.
- Argaud D, Kirby TL, Newgard CB, Lange AJ. Stimulation of glucose-6-phosphatase gene expression by glucose and fructose-2,6-bisphosphate. *J Biol Chem.* 1997 May 9;272(19):12854-61.
- Aschoff AP, Gunther E, Jirikowski GF. Tissue transglutaminase in the small intestine of the mouse as a marker for apoptotic cells. Colocalization with DNA fragmentation. *Histochem Cell Biol.* 2000 Apr;113(4):313-7.
- Ashida K, Katsura T, Motohashi H, Saito H, Inui K. Thyroid hormone regulates the activity and expression of the peptide transporter PEPT1 in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002 Apr;282(4):G617-23.
- Ashmore J, Hastings AB, Nesbett FB, Renold AE. Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. VI. Hormonal factors influencing glucose-6-phosphatase. *J Biol Chem.* 1956 Jan;218(1):77-88.
- Au A, Gupta A, Schembri P, Cheeseman CI. Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2. *Biochem J.* 2002 Oct 1;367(Pt 1):247-54.

Auchere D, Tardivel S, Gounelle JC, Druke T, Lacour B. Role of transcellular pathway in ileal Ca²⁺ absorption: stimulation by low-Ca²⁺ diet. *Am J Physiol*. 1998 Nov;275(5 Pt 1):G951-6.

B

Balasse E, Couturier E, Franckson JR. Influence of sodium beta-hydroxybutyrate on glucose and free fatty acid metabolism in normal dogs. *Diabetologia*. 1967 Dec;3(6):488-93.

Band GC, Jones CT. Functional activation by glucagon of glucose 6-phosphatase and gluconeogenesis in the perfused liver of the fetal guinea pig. *FEBS Lett*. 1980 Sep 22;119(1):190-4.

Barada KA, Saade NE, Atweh SF, Nassar CF. Neural mediation of vasoactive intestinal polypeptide inhibitory effect on jejunal alanine absorption. *Am J Physiol*. 1998 Oct;275(4 Pt 1):G822-8.

Basso LV, Havel RJ. Hepatic metabolism of free fatty acids in normal and diabetic dogs. *J Clin Invest*. 1970 Mar;49(3):537-47.

Basu TK, Donaldson D. Intestinal absorption in health and disease: micronutrients. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2003 Dec;17(6):957-79.

Bates SL, Sharkey KA, Meddings JB. Vagal involvement in dietary regulation of nutrient transport. *Am J Physiol*. 1998 Mar;274(3 Pt 1):G552-60.

Batt RM, Peters TJ. Effects of prednisolone on the small intestinal mucosa of the rat. *Clin Sci Mol Med*. 1976 Jun;50(6):511-23.

Batt RM, Scott J. Response of the small intestinal mucosa to oral glucocorticoids. *Scand J Gastroenterol Suppl*. 1982;74:75-88.

Beale E, Andreone T, Koch S, Granner M, Granner D. Insulin and glucagon regulate cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) mRNA in rat liver. *Diabetes*. 1984 Apr;33(4):328-32.

Belfrage P, Fredrikson G, Stralfors P, Tornqvist H. Adipose tissue lipases. In Borgstrom B and Brockman HL, eds. *Lipases*. Amsterdam : Elsevier, 1984 : 365-416.

Belkhou R, Cherel Y, Heitz A, Robin JP, Le Maho Y. Energy contribution of proteins and lipids during prolonged fasting in the Rat. *Nutr. Res*. 1991, 11: 365-374.

Bertile F, Oudart H, Criscuolo F, Le Maho Y, Raclot T. Hypothalamic gene expression in long-term fasted rats: relationship with body fat. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Apr 18;303(4):1106-13.

Besnard P, Bernard A, Carlier H. Quantification of mRNA coding for enterocyte fatty acid binding proteins (FABP) in rats: effect of high lipid diet and starvation. *C R Acad Sci III* 1991, 312(8): 407-13.

Bjorntorp P, Edstrom S, Kral JG, Lundholm K, Presta E, Walks D, Yang MU. Refeeding after fasting in the rat: energy substrate fluxes and replenishment of energy stores. *Am J Clin Nutr.* 1982 Sep;36(3):450-6.

Blanchard RK, Moore JB, Green CL, Cousins RJ. Modulation of intestinal gene expression by dietary zinc status: effectiveness of cDNA arrays for expression profiling of a single nutrient deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Nov 20;98(24):13507-13.

Blikslager AT, Roberts MC. Mechanisms of intestinal mucosal repair. *J Am Vet Med Assoc* 1997, 211: 1437-1441.

Bnouham M. 1995. Effets du jeûne total au froid, du jeûne partiel ou d'un développement tumoral sur la mobilisation des réserves chez le Rat. Thèse Sciences. Université Mohammed I, Oujda, Maroc.

Boffelli D, Compassi S, Werder M, Weber FE, Phillips MC, Schulthess G, Hauser H. The uptake of cholesterol at the small-intestinal brush border membrane is inhibited by apolipoproteins. *FEBS Lett.* 1997 Jul 7;411(1):7-11.

Botsios D, Economou L, Manthos A, Tsolaki M, Sioga A, Agelopoulos S, Dadoukis I, Foroglou C. Ultrastructural alterations of the rat intestinal epithelium fed with polymeric, oligopeptidic or elementary full diet, following starvation. *Histol Histopathol.* 1993 Jul;8(3):527-35.

Boyle PC, Storlien LH, Harper AE, Keeseey RE. Oxygen consumption and locomotor activity during restricted feeding and realimentation. *Am. J. Physiol.* 1981, 241: R392-R397.

Boza JJ, Moennoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsche R, Donnet A, Schiffrin EJ, Perruisseau G, Balleve O. Food deprivation and refeeding influence growth, nutrient retention and functional recovery of rats. *J Nutr.* 1999 Jul;129(7):1340-6.

Boza JJ, Moennoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Balleve O. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur J Nutr.* 2000 Dec;39(6):237-43.

Bray GA. Obesity, a disorder of nutrient partitioning: the MONA LISA hypothesis. *J. Nutr.* 1991, 121: 1146-1162.

Bronner F. Calcium absorption--a paradigm for mineral absorption. *J Nutr.* 1998 May;128(5):917-20.

Brown HO, Levine ML, Lipkin M. Inhibition of intestinal epithelial cell renewal and migration induced by starvation. *Am J Physiol* 1963, 205 (5): 868-872.

Buhman KF, Accad M, Farese RV. Mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferases. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Dec 15;1529(1-3):142-54.

Burant CF, Saxena M. Rapid reversible substrate regulation of fructose transporter expression in rat small intestine and kidney. *Am J Physiol.* 1994 Jul;267(1 Pt 1):G71-9.

Burden VR, White BD, Dean RG, Martin RJ. Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is elevated in rats with activity-based anorexia. *J. Nutr.* 1993, 123: 1217-1225.

Buts J.P., Vijverman V., Barudi C., De Keyser N., Maldague P., Dive C. Refeeding after starvation in the rat: comparative effects of lipids, proteins and carbohydrates on jejunal and ileal mucosal adaptation. *European Journal of Clinical Investigation* 1990, 20: 441-452.

Buyse M, Berlioz F, Guilmeau S, Tsocas A, Voisin T, Peranzi G, Merlin D, Laburthe M, Lewin MJ, Roze C, Bado A. PepT1-mediated epithelial transport of dipeptides and cephalixin is enhanced by luminal leptin in the small intestine. *J Clin Invest.* 2001 Nov;108(10):1483-94.

C

Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res.* 1998 Apr;39(4):777-88.

Cameron IL, Cleffmann G. Initiation of mitosis in relation to the cell cycle following feeding of starved chickens. *J Cell Biol* 1964, 21: 169-174.

Cant J.P., McBride B.W., Croom W.J. The regulation of intestinal metabolism and its impact on whole animal energetics. *J Am Soc* 1996, 74: 2541-2553.

Carey HV, Hayden UL, Tucker KE. Fasting alters basal and stimulated ion transport in piglet jejunum. *Am J Physiol.* 1994 Jul;267(1 Pt 2):R156-63.

Casirola DM, Rifkin B, Tsai W, Ferraris RP. Adaptations of intestinal nutrient transport to chronic caloric restriction in mice. *Am J Physiol.* 1996 Jul;271(1 Pt 1):G192-200.

Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol.* 1997 Sep 22;138(6):1379-94.

Chadha S, Kanwar U, Sanyal SN. Effect of sulfasalazine on adaptive and functional changes in intestine of normal and protein-calorie-malnourished rats. *Res Exp Med (Berl).* 1992;192(2):105-13.

Challet E., Le Maho Y., Robin J.P., Malan A., Cherel Y. Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1995, 50: 405-412.

Challet E. 1996. Régulation hypothalamique des rythmes biologiques dans une situation de déficit énergétique: jeûne total et restriction alimentaire. Thèse Sciences. Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.

Cheeseman CI, O'Neill D. Basolateral D-glucose transport activity along the crypt-villus axis in rat jejunum and upregulation induced by gastric inhibitory peptide and glucagon-like peptide-2. *Exp Physiol.* 1998 Sep;83(5):605-16.

- Chen HC. Molecular mechanisms of sterol absorption. *J Nutr.* 2001 Oct;131(10):2603-5.
- Chen Z, Fei YJ, Anderson CM, Wake KA, Miyauchi S, Huang W, Thwaites DT, Ganapathy V. Structure, function and immunolocalization of a proton-coupled amino acid transporter (hPAT1) in the human intestinal cell line Caco-2. *J Physiol.* 2003 Jan 15;546(Pt 2):349-61.
- Cherel Y, Le Maho Y. Five months of fasting in king penguin chicks: body mass loss and fuel metabolism. *Am J Physiol.* 1985 Oct;249(4 Pt 2):R387-92.
- Cherel Y, Robin JP, Le Maho Y. Physiology and biochemistry of long term fasting in birds. *Can J Zool.* 1988a, 66: 159-66.
- Cherel Y, Burnol AF, Leturque A, Le Maho Y. In vivo glucose utilization in rat tissues during the three phases of starvation. *Metabolism* 1988b, 37: 1033-1039.
- Cherel Y, Attaix D, Rosolowska-Huszcz D, Belkhou R, Robin JP, Arnal M, Le Maho Y. Whole-body and tissue protein synthesis during brief and prolonged fasting in the rat. *Clin Sci (Lond).* 1991 Nov;81(5):611-9.
- Cherel Y, Robin JP, Heitz A, Calgari C, Le Maho Y. Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J Comp Physiol [B].* 1992;162(4):305-13.
- Chillaron J, Roca R, Valencia A, Zorzano A, Palacin M. Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Dec;281(6):F995-1018.
- Chung BM, Wong JK, Hardin JA, Gall DG. Role of actin in EGF-induced alterations in enterocyte SGLT1 expression. *Am J Physiol.* 1999 Feb;276(2 Pt 1):G463-9.
- Clarke RM. The time-course of changes in mucosal architecture and epithelial cell production and cell shedding in the small intestine of the rat fed after fasting. *J Anat.* 1975 Nov;120(2):321-7.
- Connelly MA, Klein SM, Azhar S, Abumrad NA, Williams DL. Comparison of class B scavenger receptors, CD36 and scavenger receptor BI (SR-BI), shows that both receptors mediate high density lipoprotein-cholesteryl ester selective uptake but SR-BI exhibits a unique enhancement of cholesteryl ester uptake. *J Biol Chem.* 1999 Jan 1;274(1):41-7.
- Cooke HJ and Reddix RA. Neural regulation of intestinal electrolyte transport. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, edited by Johnson LR. New York: Raven, 1994, p. 2083–2132.
- Cooke HJ. "Enteric Tears": Chloride Secretion and Its Neural Regulation. *News Physiol Sci.* 1998 Dec;13:269-274.
- Cooke HJ. Neurotransmitters in neuronal reflexes regulating intestinal secretion. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;915:77-80.
- Coppack SW, Jensen MD, Miles JM. In vivo regulation of lipolysis in humans. *J Lipid Res.* 1994 Feb;35(2):177-93.

Craik JD, Elliott KR. Kinetics of 3-O-methyl-D-glucose transport in isolated rat hepatocytes. *Biochem J*. 1979 Aug 15;182(2):503-8.

Crook MA, Hally V, Panteli JV. The importance of the refeeding syndrome. *Nutrition*. 2001 Jul-Aug;17(7-8):632-7.

Croset M, Rajas F, Zitoun C, Hurot JM, Montano S, Mithieux G. Rat small intestine is an insulin-sensitive gluconeogenic organ. *Diabetes*. 2001 Apr;50(4):740-6.

D

Daniele N, Rajas F, Payrastra B, Mauco G, Zitoun C, Mithieux G. Phosphatidylinositol 3-kinase translocates onto liver endoplasmic reticulum and may account for the inhibition of glucose-6-phosphatase during refeeding. *J Biol Chem*. 1999 Feb 5;274(6):3597-601.

Darmon N, Pelissier MA, Heyman M, Albrecht R, Desjeux JF. Oxidative stress may contribute to the intestinal dysfunction of weanling rats fed a low protein diet. *J Nutr*. 1993 Jun;123(6):1068-75.

Das S, Yadav RK, Nagchoudhuri J. Effect of fasting on the intestinal absorption of D-glucose and D-xylose in rats in vivo. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2001 Oct;45(4):451-6.

Dave MH, Schulz N, Zecevic M, Wagner CA, Verrey F. Expression of heteromeric amino acid transporters along the intestine. *J Physiol*. 2004 May 21 [Epub ahead of print].

De Boer SF, Koopmans SJ, Slangen JL, Van der Gugten J. Effects of fasting on plasma catecholamine, corticosterone and glucose concentrations under basal and stress conditions in individual rats. *Physiol. Behav*. 1989, 45: 989-994.

Debnam ES, Levin RJ. An experimental method of identifying and quantifying the active transfer electrogenic component from the diffusive component during sugar absorption measured in vivo. *J Physiol*. 1975 Mar;246(1):181-96.

Debnam ES, Sharp PA. Acute and chronic effects of pancreatic glucagon on sugar transport across the brush-border and basolateral membranes of rat jejunal enterocytes. *Exp Physiol*. 1993 Mar;78(2):197-207.

Decrock F, Robin JP, Mioskowski E, Herzberg G, Groscolas R, Bach AC. Post-fasting restoration of body lipid and protein in the rat: effect of depletion level. *Int J Obesity*. 1998, 22 (suppl. 3): S178.

Desjeux JF, Simell RO, Dumontier AM, Perheentupa J. Lysine fluxes across the jejunal epithelium in lysinuric protein intolerance. *J Clin Invest*. 1980 Jun;65(6):1382-7.

Diab-Assef M, Reimund JM, Ezenfis J, Duclos B, Kedinger M, Foltzer-Jourdainne C (2002) The phosphodiesterase inhibitor, pentoxifylline, alters rat intestinal epithelial cell proliferation via changes in the expression of transforming growth factors. *Scand J Gastroenterol* 37(2): 206-14.

Diamond JM. Transcellular cross-talk between epithelial cell membranes. *Nature*. 1982 Dec 23;300(5894):683-5.

Diamond JM, Karasov WH, Cary C, Enders D, Yung R. Effect of dietary carbohydrate on monosaccharide uptake by mouse small intestine in vitro. *J Physiol*. 1984 Apr;349:419-40.

Dulloo AG, Girardier L. Adaptive changes in energy expenditure during refeeding following low-calorie intake: evidence for a specific metabolic component favoring fat storage. *Am J Clin Nutr*. 1990 Sep;52(3):415-20.

Dulloo AG, Calokatisa R. Adaptation to low calorie intake in obese mice - contribution of a metabolic component to diminished energy expenditures during and after weight loss. *Int. J. Obesity* 1991, 15: 7-16.

Dulloo AG, Girardier L. 24 hour energy expenditure several months after weight loss in the underfed rat - evidence for a chronic increase in whole-body metabolic efficiency. *Int. J. Obesity* 1993, 17: 115-123.

Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L. Dissociation of enhanced efficiency of fat deposition during weight recovery from sympathetic control of thermogenesis. *Am. J. Physiol*. 1995, 38: R365-R369.

Dunel-Erb S, Chevalier C, Laurent P, Bach A, Decrock F, Le Maho Y. Restoration of the jejunal mucosa in rats refed after prolonged fasting. *Comp Biochem Physiol* 2001, 129 A: 933-947.

E

Eaton RP, Berman M, Steinberg D. Kinetic studies of plasma free fatty acid and triglyceride metabolism in man. *J Clin Invest*. 1969 Aug;48(8):1560-79.

Eckert R., Randall D., Burggren W., French K. *Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations*. W.H. Freeman and Company. 1978, Third edition: 534-554.

Edens NK, Leibel RL, Hirsch J. Mechanism of free fatty acid re-esterification in human adipocytes in vitro. *J Lipid Res*. 1990 Aug;31(8):1423-31.

Elitsur Y, Lichtman SN, Neace C, Dosesco J, Moshier JA. Immunosuppressive effect of budesonide on human lamina propria lymphocytes. *Immunopharmacology*. 1998 Jan;38(3):279-85.

El Hadri K, Feve B, Pairault J. Developmental expression and functional activity of beta 1- and beta 3-adrenoceptors in murine 3T3-F442A differentiating adipocytes. *Eur J Pharmacol*. 1996 Feb 15;297(1-2):107-19.

Elkjaer ML, Nejsum LN, Gresz V, Kwon TH, Jensen UB, Frokiaer J, Nielsen S. Immunolocalization of aquaporin-8 in rat kidney, gastrointestinal tract, testis, and airways. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Dec;281(6):F1047-57.

Elmes M.E. Apoptosis in the small intestine of zinc-deficient and fasted rats. *J Pathol* 1977, 123: 219-223.

Erickson RH, Gum JR Jr, Lindstrom MM, McKean D, Kim YS. Regional expression and dietary regulation of rat small intestinal peptide and amino acid transporter mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Nov 2;216(1):249-57.

F

Ferraris RP, Diamond JM. Specific regulation of intestinal nutrient transporters by their dietary substrates. *Annu Rev Physiol*. 1989;51:125-41.

Ferraris RP, Lee PP, Diamond JM. Origin of regional and species differences in intestinal glucose uptake. *Am J Physiol*. 1989 Nov;257(5 Pt 1):G689-97.

Ferraris RP, Diamond J. Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev*. 1997 Jan;77(1):257-302.

Ferraris RP, Carey HV. Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:195-219.

Ferraris R.P. Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport. *Biochem J* 2001, 360: 265-276.

Fery F, Plat L, Melot C, Balasse EO. Role of fat-derived substrates in the regulation of gluconeogenesis during fasting. *Am J Physiol*. 1996 May;270(5 Pt 1):E822-30.

Fesus L (1993) Biochemical events in naturally occurring forms of cell death. *FEBS Lett* 328: 1-5.

Fesus L, Madi A, Balajthy Z, Nemes Z, Szondy Z. Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia*. 1996 Oct 31;52(10-11):942-9.

Field FJ, Born E, Murthy S, Mathur SN. Caveolin is present in intestinal cells: role in cholesterol trafficking? *J Lipid Res*. 1998 Oct;39(10):1938-50.

Flatt JP. Opposite effects of variations in food intake on carbohydrate and fat oxidation in ad libitum fed mice. *J. Nutr. Biochem*. 1991, 2: 186-192.

Foligne B, Aissaoui S, Senegas-Balas F, Cayuela C, Bernard P, Antoine JM, Balas D (2001) Changes in cell proliferation and differentiation of adult rat small intestine epithelium after adrenalectomy: kinetic, biochemical, and morphological studies. *Dig Dis Sci* 46(6): 1236-46.

Forest C, Franckhauser S, Glorian M, Antras-Ferry J, Robin D, Robin P. Regulation of gene transcription by fatty acids, fibrates and prostaglandins: the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene as a model. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1997 Jul;57(1):47-56.

Forsum E, Hillman PE, Nesheim MC. Effect of energy restriction on total heat production, basal metabolic rate, and specific dynamic action of food in rats. *J. Nutr.* 1981, 111: 1691-1697.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med.* 1995 Dec;1(12):1311-4.

Fréminet A. Comparison of glycogen store in rats and guinea-pigs: effects of anaesthesia, fasting and re-feeding. *Comp Biochem Physiol.* 1981, 69(B): 655-663.

Freund JN, Foltzer-Jourdainne C, Duluc I, Galluser M, Gosse F, Raul F. Rat lactase activity and mRNA expression in relation to the thyroid and corticoid status. *Cell Mol Biol.* 1991;37(4):463-6.

Freund JN, Domon-Dell C, Kedinger M, Duluc I (1998) The Cdx-1 and Cdx-2 homeobox genes in the intestine. *Biochem Cell Biol* 76(6): 957-69.

Friedman JE, Yun JS, Patel YM, McGrane MM, Hanson RW. Glucocorticoids regulate the induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription during diabetes. *J Biol Chem.* 1993 Jun 15;268(17):12952-7.

Friedman MI. Control of energy intake by energy metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 1995, 62S: 1096S-1100S.

Friedman MI, Tordoff MG. Fatty acid oxidation and glucose utilization interact to control food intake in rats. *Am. J. Physiol.* 1986, 251: R840-R845.

Frohnert BI, Bernlohr DA. Regulation of fatty acid transporters in mammalian cells. *Prog Lipid Res.* 2000 Jan;39(1):83-107.

G

Gal-Garber O, Mabweesh SJ, Sklan D, Uni Z. Partial sequence and expression of the gene for and activity of the sodium glucose transporter in the small intestine of fed, starved and refed chickens. *J Nutr* 2000 Sep; 130(9): 2174-9.

Gallagher JC, Riggs BL, Eisman J, Hamstra A, Arnaud SB, DeLuca HF. Intestinal calcium absorption and serum vitamin D metabolites in normal subjects and osteoporotic patients: effect of age and dietary calcium. *J Clin Invest.* 1979 Sep;64(3):729-36.

Galluser M, Belkhou R, Freund JN, Duluc I, Torp N, Danielsen M, Raul F. Adaptation of intestinal hydrolases to starvation in rats: effect of thyroid function. *J Comp Physiol [B].* 1991;161(4):357-61.

Gautier-Stein A, Domon-Dell C, Calon A, Bady I, Freund JN, Mithieux G, Rajas F. Differential regulation of the glucose-6-phosphatase TATA box by intestine-specific homeodomain proteins CDX1 and CDX2. *Nucleic Acids Res.* 2003 Sep 15;31(18):5238-46.

- Glomset JA. The plasma lecithins: cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res.* 1968 Mar;9(2):155-67.
- Goda T., Takase S. Dietary carbohydrate and fat independently modulate disaccharidase activities in rat jejunum. *J Nutr* 1994, 124: 2233-2239.
- Goda T. Regulation of the expression of carbohydrate digestion/absorption-related genes. *Br J Nutr.* 2000 Dec;84 Suppl 2:S245-8.
- Goodlad RA, Plumb JA, Wright NA. Epithelial cell proliferation and intestinal absorptive function during starvation and refeeding in the rat. *Clin Sci (Lond).* 1988 Mar;74(3):301-6.
- Goodman MN, Larsen PR, Kaplan MM, Aoki TT, Young VR, Ruderman NB. Starvation in the rat. II. Effect of age and obesity on protein sparing and fuel metabolism. *Am J Physiol.* 1980 Oct;239(4):E277-E286.
- Goodman MN, Lowell B, Ruderman NB. Protein conservation during starvation: possible role of lipid fuels. *Prog Clin Biol Res.* 1982;102 Pt C:317-31.
- Gotoh M, Iguchi A, Tajima T, Ikari H, Hirooka Y. Starvation reduces norepinephrine activities in both hypothalamus and heart in rats. *Brain Res.* 1996, 706: 351-354.
- Goudriaan JR, Dahlmans VE, Febbraio M, Teusink B, Romijn JA, Havekes LM, Voshol PJ. Intestinal lipid absorption is not affected in CD36 deficient mice. *Mol Cell Biochem.* 2002 Oct;239(1-2):199-202.
- Grisham MB, Gaginella TS, von Ritter C, Tamai H, Be RM, Granger DN. Effects of neutrophil-derived oxidants on intestinal permeability, electrolyte transport, and epithelial cell viability. *Inflammation.* 1990 Oct;14(5):531-42.
- Groos S, Reale E, Hunefeld G, Luciano L. Changes in epithelial cell turnover and extracellular matrix in human small intestine after TPN. *J Surg Res.* 2003 Feb;109(2):74-85.
- Grossmann J, Mohr S, Lapentina EG, Fiocchi C, Levine AD. Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am J Physiol.* 1998 Jun;274(6 Pt 1):G1117-24.
- Grossmann J, Walther K, Artinger M, Rummele P, Woenckhaus M, Scholmerich J. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *Am J Gastroenterol.* 2002 Jun;97(6):1421-8.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 1997 Jul 31;388(6641):482-8.
- Gupta PD, Waheed AA. Effect of starvation on glucose transport and membrane fluidity in rat intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.* 1992 Apr 6;300(3):263-7.

H

Hagan JJ, Leslie RA, Patel S, Evans ML, Wattam TA, Holmes S, Benham CD, Taylor SG, Routledge C, Hemmati P, Munton RP, Ashmeade TE, Shah AS, Hatcher JP, Hatcher PD, Jones DN, Smith MI, Piper DC, Hunter AJ, Porter RA, Upton N. Orexin A activates locus coeruleus cell firing and increases arousal in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 14;96(19):10911-6.

Hague A, Bracey TS, Hicks DJ, Reed JC, Paraskeva C (1998) Decreased levels of p26-Bcl-2, but not p30 phosphorylated Bcl-2, precede TGFbeta1-induced apoptosis in colorectal adenoma cells. *Carcinogenesis* 19(9): 1691-5.

Hakim NS, Walters AM, Zinsmeister AR, Sarr MG. Net absorption of water, electrolytes, glucose, and folate from the in vivo, neurally isolated canine jejunum. *Surgery*. 1992 Apr;111(4):394-401.

Hanson RW, Garber AJ. Phosphoenolpyruvate carboxykinase. I. Its role in gluconeogenesis. *Am J Clin Nutr*. 1972 Oct;25(10):1010-21.

Hansen GH, Niels-Christiansen LL, Immerdal L, Danielsen EM. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) in pig enterocytes: trafficking from the brush border to lipid droplets during fat absorption. *Gut*. 2003 Oct;52(10):1424-31.

Hardin J, Kroeker K, Chung B, Gall DG. Effect of proinflammatory interleukins on jejunal nutrient transport. *Gut*. 2000 Aug;47(2):184-91.

Hatakeyama S, Yoshida Y, Tani T, Koyama Y, Nihei K, Ohshiro K, Kamiie JI, Yaoita E, Suda T, Hatakeyama K, Yamamoto T. Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Oct 5;287(4):814-9.

Hauser H., Dyer J., Nandy A., Vega M., Werder M. et al. Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine. *Biochemistry* 1998, 37: 17843-17850.

Hayden UL, Carey HV. Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Jun;278(6):R1589-94.

Hebebrand J, Exner C, Hebebrand K, Holtkamp C, Casper RC, Remschmidt H, Herpertz-Dahlmann B, Klingenspor M. Hyperactivity in patients with anorexia nervosa and in semistarved rats: evidence for a pivotal role of hypoleptinemia. *Physiol Behav*. 2003 Jun;79(1):25-37.

Helliwell PA, Richardson M, Affleck J, Kellett GL. Stimulation of fructose transport across the intestinal brush-border membrane by PMA is mediated by GLUT2 and dynamically regulated by protein kinase C. *Biochem J*. 2000a Aug 15;350 Pt 1:149-54.

Helliwell PA, Richardson M, Affleck J, Kellett GL. Regulation of GLUT5, GLUT2 and intestinal brush-border fructose absorption by the extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase intracellular signalling pathways: implications for adaptation to diabetes. *Biochem J*. 2000b Aug 15;350 Pt 1:163-9.

Hernandes L, Zucoloto S, Alvares EP. Effect of myenteric denervation on intestinal epithelium proliferation and migration of suckling and weanling rats. *Cell Prolif*. 2000 Jun;33(3):127-38.

Hirsh AJ, Cheeseman CI. Cholecystokinin decreases intestinal hexose absorption by a parallel reduction in SGLT1 abundance in the brush-border membrane. *J Biol Chem*. 1998 Jun 5;273(23):14545-9.

Hirvonen MD, Keeseey RE. Chronically altered body protein levels following lateral hypothalamic lesions in rats. *Am. J. Physiol*. 1996, 270: R738-R743.

Holle GE, Granat T, Reiser SB, Holle F. Effects of superior mesenteric and coeliac ganglionectomy on the small intestinal mucosa in the Hanford mini pig. I. Histological and enzyme-histochemical study. *J Auton Nerv Syst*. 1989 Mar;26(2):135-45.

Holle GE. Changes in the structure and regeneration mode of the rat small intestinal mucosa following benzalkonium chloride treatment. *Gastroenterology*. 1991 Nov;101(5):1264-73.

Holt P.R., Moss S.F., Heydari A.R., Richardson A. Diet restriction increases apoptosis in the gut of aging rats. *J Gerontol* 1998, 53A: B168-B172.

Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 26; 84(2): 299-308.

I

Iannoli P, Miller JH, Ryan CK, Sax HC. Glucocorticoids upregulate intestinal nutrient transport in a time-dependent and substrate-specific fashion. *J Gastrointest Surg*. 1998 Sep-Oct;2(5):449-57.

Ihara T, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Ueyama H, Ohkubo I, Bamba T. Enhancement of brush border membrane peptidase activity in rat jejunum induced by starvation. *Pflugers Arch*. 2000a May;440(1):75-83.

Ihara T, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T. Regulation of PepT1 peptide transporter expression in the rat small intestine under malnourished conditions. *Digestion* 2000b, 61(1): 59-67.

Inui A, Meguid MM. Cachexia and obesity: two sides of one coin? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003 Jul;6(4):395-9.

Ishibashi K, Morinaga T, Kuwahara M, Sasaki S, Imai M. Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Jul 19;1576(3):335-40.

Iwakiri R., Gotoh Y., Noda T., Sugihara H., Fujimoto K., Fuseler J., Aw T.Y. Programmed cell death in rat intestine: Effect of feeding and fasting. *Scand J Gastroenterol* 2001, 36: 39-47.

J

Jéquier E. 1992. Calorie balance versus nutrient balance. In: *Energy metabolism: tissue determinants and corollaries*. Eds: Kinney J.M., Tucker H.N. New-York: Raven Press. pp. 123-137.

Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 1997 Aug 22;272(34):20982-5.

Jiang G, Zhang BB. Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Apr;284(4):E671-8.

Johnson LR. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physiol Rev*. 1988 Apr;68(2):456-502.

K

Kaiser GC, Polk DB (1997) Tumor necrosis factor alpha regulates proliferation in a mouse intestinal cell line. *Gastroenterology* 112(4): 1231-40.

Kayalar C, Ord T, Testa MP, Zhong LT, Bredesen DE. Cleavage of actin by interleukin 1 beta-converting enzyme to reverse DNase I inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 5;93(5):2234-8.

Kellett GL, Helliwell PA. The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem J*. 2000 Aug 15;350 Pt 1:155-62.

Kellett GL. The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J Physiol*. 2001 Mar 15;531(Pt 3):585-95.

Kishi K, Tanaka T, Igawa M, Takase S, Goda T. Sucrase-isomaltase and hexose transporter gene expressions are coordinately enhanced by dietary fructose in rat jejunum. *J Nutr*. 1999 May;129(5):953-6.

Kleiber M. 1961. *The fire of life*. New-York: John Wiley and Sons.

Klein RM. Analysis of intestinal cell proliferation after guanethidine-induced sympathectomy. II. Percentage labelled mitoses studies. *Cell Tissue Kinet.* 1979 Nov;12(6):649-57.

Ko TC, Yu W, Sakai T, Sheng H, Shao J, Beauchamp RD, Thompson EA. TGF-beta1 effects on proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression. *Oncogene.* 1998 Jul 2;16(26):3445-54.

Kojima H, Hidaka H, Matsumura K, Fujita Y, Nishio Y, Maegawa H, Haneda M, Yasuda H, Fujimiya M, Kikkawa R, Kashiwagi A. Concerted regulation of early enterocyte differentiation by insulin-like growth factor I, insulin, and transforming growth factor-beta1. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998 May-Jun;110(3):197-206.

Kong S, Hall JC, Cooper D, McCauley RD. Starvation alters the activity and mRNA level of glutaminase and glutamine synthetase in the rat intestine. *J Nutr Biochem.* 2000 Jul 1;11(7-8):393-400.

Koubi HE, Robin JP, Dewasmes G, Le Maho Y, Frutoso J, Minaire Y. Fasting-induced rise in locomotor activity in rats coincides with increased protein utilization. *Physiol Behav.* 1991 Aug;50(2):337-43.

Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K, Kihara I. Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 1999 Mar;276(3 Pt 1):C621-7.

Kreydiyyeh SI, Haddad JJ, Garabedian BS. Interleukin-1 beta inhibits the intestinal transport of [¹⁴C] 3-O-methylglucose in the rat. *Life Sci.* 1998;63(21):1913-9.

Krishnamra N, Wirunrattanakij Y, Limlomwongse L. Acute effects of prolactin on passive calcium absorption in the small intestine by in vivo perfusion technique. *Can J Physiol Pharmacol.* 1998 Feb;76(2):161-8.

L

Lachat JJ, Goncalves RP. Influence of autonomic denervation upon the kinetics of the ileal epithelium of the rat. *Cell Tissue Res.* 1978 Sep 5;192(2):285-97.

Lane A, Levin RJ. Enhanced electrogenic secretion in vitro by small intestine from glucagon-treated rats: implications for the diarrhoea of starvation. *Exp Physiol.* 1992 Jul;77(4):645-8.

Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1997 Jun;138(6):2569-76.

Le Maho Y, Delclitte P, Chatonnet J. Thermoregulation in fasting emperor penguins under natural conditions. *Am J Physiol.* 1976 Sep;231(3):913-22.

Levin RJ. The diarrhoea of famine and severe malnutrition--is glucagon the major culprit? *Gut.* 1992 Apr;33(4):432-4.

Lin B, Morris DW, Chou JY. The role of HNF1alpha, HNF3gamma, and cyclic AMP in glucose-6-phosphatase gene activation. *Biochemistry*. 1997 Nov 18;36(46):14096-106.

Lobo M., Huerta L., Ruiz-Velasco N., Teixeira E. et al. Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract : Towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids. *J Histochem Cytochem* 2001, 49: 1253-1260.

Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M, Freund JN (1997) Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 15; 139(6): 1553-65.

Lostao MP, Urdaneta E, Martinez-Anso E, Barber A, Martinez JA. Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Lett*. 1998 Feb 27;423(3):302-6.

Lowell BB, Goodman MN. Protein sparing in skeletal muscle during prolonged starvation. Dependence on lipid fuel availability. *Diabetes*. 1987 Jan;36(1):14-9.

Lubkin M, Stricker-Krongrad A. Independent feeding and metabolic actions of orexins in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Dec 18;253(2):241-5.

Luciano L, Gupta PD, Groos S, Adamski J. Modulation of apoptosis by starvation: morphological and biochemical study of rat intestinal mucosa. *Cell Death and Diff* 1995 2: 259-266.

Luciano L, Groos S, Sridhar Rao K, Gupta PD, Reale E. Early morphological events during apoptotic process in enterocytes. *Rec Adv Microsc* 1997;391-395.

Luke A, Schoeller DA. Basal metabolic rate, fat-free mass, and body cell mass during energy restriction. *Metabolism* 1992, 41: 450-456.

M

Ma T, Verkman AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol*. 1999 Jun 1;517 (Pt 2):317-26.

Madara JL, Trier JS. Functional Morphology of the mucosa of the small intestine. In: Johnson LR, eds. *Physiology of the gastrointestinal tract*. 2nd ed. New York : Raven Press, 1987: 1209-1249.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995 Nov;1(11):1155-61.

Mallordy A, Poirier H, Besnard P, Niot I, Carlier H. Evidence for transcriptional induction of the liver fatty-acid-binding-protein gene by bezafibrate in the small intestine. *Eur J Biochem*. 1995 Feb 1;227(3):801-7.

Mandir N, Goodlad RA. The effects of glutamine on intestinal epithelial cell proliferation in parenterally fed rats. *Gut*. 1999 May;44(5):608-14.

Marciani P, Lindi C, Faelli A, Esposito G. Effects of semistarvation on transintestinal D-glucose transport and D-glucose uptake in brush border and basolateral membranes of rat enterocytes. *Pflügers Arch*. 1987 Mar;408(3):220-3.

Marliss EB, Aoki TT, Unger RH, Soeldner JS, Cahill GF Jr. Glucagon levels and metabolic effects in fasting man. *J Clin Invest*. 1970 Dec;49(12):2256-70.

Marshman E, Ottewell PD, Potten CS, Watson AJ. Caspase activation during spontaneous and radiation-induced apoptosis in the murine intestine. *J Pathol*. 2001 Oct;195(3):285-92.

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1545-56.

Matosin-Matekalo M, Mesonero JE, Laroche TJ, Lacasa M, Brot-Laroche E. Glucose and thyroid hormone co-regulate the expression of the intestinal fructose transporter GLUT5. *Biochem J*. 1999 Apr 15;339 (Pt 2):233-9.

Mayhew TM. Striated brush border of intestinal absorptive epithelial cells: stereological studies on microvillous morphology in different adaptive states. *J Electron Microscop Tech*. 1990 Sep;16(1):45-55.

McDonald BE, Johnson BC. Metabolic response to realimentation following chronic starvation in the adult male rat. *J Nutr*. 1965 Oct;87(2):161-7.

Misch DW, Giebel PE, Faust RG. Intestinal microvilli: responses to feeding and fasting. *Eur J Cell Biol*. 1980 Aug;21(3):269-79.

Mithieux G. New data and concepts on glutamine and glucose metabolism in the gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2001 Jul;4(4):267-71.

Mithieux G, Bady I, Gautier A, Croset M, Rajas F, Zitoun C. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Mar;286(3):E370-5. Epub 2003 Oct 14.

Miyamoto K, Hase K, Takagi T, Fujii T, Taketani Y, Minami H, Oka T, Nakabou Y. Differential responses of intestinal glucose transporter mRNA transcripts to levels of dietary sugars. *Biochem J*. 1993 Oct 1;295 (Pt 1):211-5.

Moore R, Carlson S, Madara JL. Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury. *Am J Physiol* 1989, 257: G274-G283.

Morohashi T, Sano T, Ohta A, Yamada S. True calcium absorption in the intestine is enhanced by fructooligosaccharide feeding in rats. *J Nutr*. 1998 Oct;128(10):1815-8.

Morton NM, Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA. Leptin action in intestinal cells. *J Biol Chem.* 1998 Oct 2;273(40):26194-201.

Mulligan JD, Flowers MT, Tebon A, Bitgood JJ, Wellington C, Hayden MR, Attie AD. ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11;278(15):13356-66. Epub 2003 Jan 27.

Munck LK. Chloride-dependent amino acid transport in the small intestine: occurrence and significance. *Biochim Biophys Acta.* 1995 Jul 17;1241(2):195-213.

Munck BG, Munck LK. Effects of pH changes on systems ASC and B in rabbit ileum. *Am J Physiol.* 1999 Jan;276(1 Pt 1):G173-84.

Munck LK, Grondahl ML, Thorboll JE, Skadhauge E, Munck BG. Transport of neutral, cationic and anionic amino acids by systems B, b(o,+), X(AG), and ASC in swine small intestine. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2000 Aug;126(4):527-37.

Murray D, Wild GE. Effect of fasting on Na-K-ATPase activity in rat small intestinal mucosa. *Can J Physiol Pharmacol.* 1980 Jun;58(6):643-9.

Musso F, Lachat JJ, Cruz AR, Goncalves RP. Effect of denervation on the mitotic index of the intestinal epithelium of the rat. *Cell Tissue Res.* 1975 Nov 12;163(3):395-402.

N

Nakamura T, Uramura K, Nambu T, Yada T, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Orexin-induced hyperlocomotion and stereotypy are mediated by the dopaminergic system. *Brain Res.* 2000 Aug 4;873(1):181-7.

Nieto N, Torres MI, Rios A, Gil A. Dietary polyunsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J Nutr.* 2002 Jan;132(1):11-9.

Nordlie RC, Arion WJ, Glende EA Jr. Liver microsomal glucose 6-phosphatase, inorganic pyrophosphatase, and pyrophosphate-glucose phosphotransferase. IV. Effects of adrenalectomy and cortisone administration on activities assayed in the absence and presence of deoxycholate. *J Biol Chem.* 1965 Sep;240(9):3479-84.

Nordlie RC. Glucose-6 phosphatase phosphotransferase: roles and regulation in relation to gluconeogenesis. In: Hanson RW, Mehlman MA, eds. *Gluconeogenesis: its regulation in mammalian species.* New York: Wiley, 1976:53-152.

Nzegwu HC, Levin RJ. Role of the enteric nervous system in the maintained hypersecretion induced by enterotoxin STa in the nutritionally deprived intestine. *Gut.* 1994 Sep;35(9):1237-43.

O

Ockner RK, Manning JA. Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J Clin Invest.* 1974 Aug;54(2):326-38.

Ogihara H., Saito H., Shin B.C., Terada T., Takenoshita S. et al. Immuno-localization of H⁺/peptide cotransporter in rat digestive tract. *Biochem and Biophys Res Com* 1996, 220: 848-852.

Ogihara H, Suzuki T, Nagamachi Y, Inui K, Takata K. Peptide transporter in the rat small intestine: ultrastructural localization and the effect of starvation and administration of amino acids. *Histochem J* 1999 Mar; 31(3): 169-74.

Okada S, Misaka T, Matsumoto I, Watanabe H, Abe K. Aquaporin-9 is expressed in a mucus-secreting goblet cell subset in the small intestine. *FEBS Lett.* 2003 Apr 10;540(1-3):157-62.

P

Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev.* 1998 Oct;78(4):969-1054.

Pirke KM, Broocks A, Wilckens T, Marquard R, Schweiger U. Starvation-induced hyperactivity in the Rat. The role of endocrine and neurotransmitter changes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1993, 17: 287-294.

Play B, Salvini S, Haikal Z, Charbonnier M, Harbis A, Roussel M, Lairon D, Jourdheuil-Rahmani D. Glucose and galactose regulate intestinal absorption of cholesterol. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Oct 17;310(2):446-51.

Poirier H, Degrace P, Niot I, Bernard A, Besnard P. Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem.* 1996 Jun 1;238(2):368-73.

Poirier H, Niot I, Degrace P, Monnot MC, Bernard A, Besnard P. Fatty acid regulation of fatty acid-binding protein expression in the small intestine. *Am J Physiol.* 1997 Aug;273(2 Pt 1):G289-95.

Potten C.S., Allen T.D. Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa. *J Ultrastruct Res* 1977, 60: 272-277.

Potten C.S., Merritt A., Hickman J., Hall P., Faranda A. Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. *Int J Radiat Biol* 1994, 65: 71-78.

Potten CS. Epithelial cell growth and differentiation. II. Intestinal apoptosis. *Am J Physiol.* 1997 Aug;273(2 Pt 1):G253-7.

Potten CS, Booth C, Pritchard DM. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* 1997, 78: 219-243.

Potten CS. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998, 353: 821-830.

Poullain MG, Cezard JP, Roger L, Mendy F. Effect of whey proteins, their oligopeptide hydrolysates and free amino acid mixtures on growth and nitrogen retention in fed and starved rats. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1989 Jul-Aug;13(4):382-6.

R

Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology.* 1999 Jul;117(1):132-9.

Rajas F, Croset M, Zitoun C, Montano S, Mithieux G. Induction of PEPCK gene expression in insulinopenia in rat small intestine. *Diabetes.* 2000 Jul;49(7):1165-8.

Ramirez-Lorca R, Vizuite ML, Venero JL, Revuelta M, Cano J, Ilundain AA, Echevarria M. Localization of aquaporin-3 mRNA and protein along the gastrointestinal tract of Wistar rats. *Pflugers Arch.* 1999 Jun;438(1):94-100.

Rampal P. Adaptation structurelle et fonctionnelle de l'intestin grêle à l'alimentation. *Nutrition clinique* 1993, 38: 1-6.

Rao RH. Fasting glucose homeostasis in the adaptation to chronic nutritional deprivation in rats. *Am. J. Physiol.* 1995, 268: E873-E879.

Raul F., Noriega R., Doffoel M., Grenier J.F., Haffen K. Modifications of brush border enzymes activities during starvation in the jejunum and ileum of adult rats. *Enzyme* 1982, 28: 328-335.

Raul F, Schleiffer R. Intestinal adaptation to nutritional stress. *Proc Nutr Soc* 1996, 55: 279-289.

Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* 2000 Sep 1;289(5484):1524-9.

Rhoads DB, Rosenbaum DH, Unsal H, Isselbacher KJ, Levitsky LL. Circadian periodicity of intestinal Na⁺/glucose cotransporter 1 mRNA levels is transcriptionally regulated. *J Biol Chem.* 1998 Apr 17;273(16):9510-6.

Rigaud D, Hassid J, Meulemans A, Poupard AT, Boulier A. A paradoxical increase in resting energy expenditure in malnourished patients near death: the king penguin syndrome. *Am J Clin Nutr.* 2000 Aug;72(2):355-60.

Rigotti A, Acton SL, Krieger M. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem.* 1995 Jul 7;270(27):16221-4.

Roberts WG, Fedorak RN, Chang EB. In vitro effects of the long-acting somatostatin analogue SMS 201-995 on electrolyte transport by the rabbit ileum. *Gastroenterology.* 1988 Jun;94(6):1343-50.

Roberts TJ, Azain MJ, Hausman GJ, Martin RJ. Interaction of insulin and somatotropin on body weight gain, food intake, and body composition in rats. *Am. J. Physiol.* 1994, 267: E293-E299.

Robin JP, Frain M, Sardet C, Groscolas R, Le Maho Y. Protein and lipid utilization during long-term fasting in emperor penguins. *Am J Physiol.* 1988 Jan;254(1 Pt 2):R61-8.

Robin JP, Boucontet L, Chillet P, Groscolas R. Behavioral changes in fasting emperor penguins: evidence for a "refeeding signal" linked to a metabolic shift. *Am J Physiol.* 1998 Mar;274(3 Pt 2):R746-53.

Robinson AM, Williamson DH. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev.* 1980 Jan;60(1):143-87.

Rossi R, Meissner A, Del Prete E, Scharrer E. Hepatic branch vagotomy enhances feeding in response to centrally elicited glucose deprivation in rats. *Exp. Physiol.* 1996, 81: 119-129.

Rothwell NJ, Stock MJ. Effect of chronic food restriction on energy balance, thermogenic capacity, and brown adipose tissue activity in the rat. *Biosc. Rep.* 1982, 2: 543-549.

S

Samuels SE, Taillandier D, Aourousseau E, Cherel Y, Le Maho Y, Arnal M, Attaix D. Gastrointestinal tract protein synthesis and mRNA levels for proteolytic systems in adult fasted rats. *Am J Physiol.* 1996 Aug;271(2 Pt 1):E232-8.

Santer R, Hillebrand G, Steinmann B, Schaub J. Intestinal glucose transport: evidence for a membrane traffic-based pathway in humans. *Gastroenterology.* 2003 Jan;124(1):34-9.

Schadereit R, Klein M, Rehfeldt C, Kreienbring F, Krawielitzki K. Influence of nutrient restriction and realimentation on protein and energy metabolism, organ weights, and muscle structure in growing rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 1995, 74: 253-268.

Schaeffer C, Diab-Assef M, Plateroti M, Laurent-Huck F, Reimund JM, Kedinger M, Foltzer-Jourdainne C. Cytokine gene expression during postnatal small intestinal development: regulation by glucocorticoids. *Gut.* 2000 Aug;47(2):192-8.

Schmitz J, Preiser H, Maestracci D, Ghosh BK, Cerda JJ, Crane RK. Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1973 Sep 27;323(1):98-112.

Schmoll D, Wasner C, Hinds CJ, Allan BB, Walther R, Burchell A. Identification of a cAMP response element within the glucose- 6-phosphatase hydrolytic subunit gene promoter which is involved in the transcriptional regulation by cAMP and glucocorticoids in H4IIE hepatoma cells. *Biochem J*. 1999 Mar 1;338 (Pt 2):457-63.

Schroeder F., Jolly C.A., Cho T.H., Frolow A. Fatty acid binding protein isoforms: structure and function. *Chemistry and Physics of Lipids* 1998, 92: 1-25.

Schulthess G, Compassi S, Werder M, Han CH, Phillips MC, Hauser H. Intestinal sterol absorption mediated by scavenger receptors is competitively inhibited by amphipathic peptides and proteins. *Biochemistry*. 2000 Oct 17;39(41):12623-31.

Sclafani A, Rendel A Food deprivation-induced activity in dietary obese, dietary lean, and normal-weight rats. *Behav Biol*. 1978b Oct;24(2):220-8.

Scott DK, O'Doherty RM, Stafford JM, Newgard CB, Granner DK. The repression of hormone-activated PEPCK gene expression by glucose is insulin-independent but requires glucose metabolism. *J Biol Chem*. 1998 Sep 11;273(37):24145-51.

See NA, Epstein ML, Dahl JL, Bass P. The myenteric plexus regulates cell growth in rat jejunum. *J Auton Nerv Syst*. 1990 Dec;31(3):219-29.

Shaw JH, Wolfe RR. Influence of beta-hydroxybutyrate infusion on glucose and free fatty acid metabolism in dogs. *Am J Physiol*. 1984 Dec;247(6 Pt 1):E756-64.

Shen H, Smith DE, Brosius FC 3rd. Developmental expression of PEPT1 and PEPT2 in rat small intestine, colon, and kidney. *Pediatr Res*. 2001 Jun;49(6):789-95.

Shepherd EJ, Lister N, Affleck JA, Bronk JR, Kellett GL, Collier ID, Bailey PD, Boyd CA. Identification of a candidate membrane protein for the basolateral peptide transporter of rat small intestine. : *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Aug 30;296(4):918-22.

Shibahara T., Sato N., Waguri S. et al. The fate of effete epithelial cells at the villus tips of the human small intestine. *Arch Histol Cytol* 1995, 58: 205-219.

Shiraga T, Miyamoto K, Tanaka H, Yamamoto H, Taketani Y, Morita K, Tamai I, Tsuji A, Takeda E. Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/Peptide transporter PepT1. *Gastroenterology*. 1999 Feb;116(2):354-62.

Shorey CD, Manning LA, Grant AL, Everitt AV. Morphometrical analysis of the short-term effects of hypophysectomy and food restriction on skeletal muscle fibers in relation to growth and aging changes in the Rat. *Growth Dev*. Aging 1992, 56: 85-93.

Shorey CD, Everitt AV, Armstrong RA, Manning LA. Morphometrical analysis of the muscle fibres of the soleus muscle of the ageing rat: long-term effect of hypophysectomy and food restriction. *Gerontol*. 1993, 39: 80-92.

Shu HJ, Takeda H, Shinzawa H, Takahashi T, Kawata S. Effect of lipopolysaccharide on peptide transporter 1 expression in rat small intestine and its attenuation by dexamethasone. *Digestion*. 2002;65(1):21-9.

Stahl A., Hirsch D.J., Gimeno R.E., Punreddy S., Ge P., Watson N., Patel S., Kotler M., Raimondi A., Tartaglia L.A., Lodish H.F. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol Cell* 1999, 4(3): 299-308.

Stahl A., Gimeno R., Tartaglia L.A., Lodish H.J. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2001, 12: 266-273.

Starck JM, Beese K. Structural flexibility of the intestine of Burmese python in response to feeding. *J Exp Biol*. 2001 Jan;204(Pt 2):325-35.

Steffens AB, Strubbe JH, Balkan B, Scheurink AJW. Neuroendocrine mechanisms involved in regulation of body weight, food intake and metabolism. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1990, 14: 305-313.

Stewart CP, Turnberg LA. A microelectrode study of responses to secretagogues by epithelial cells on villus and crypt of rat small intestine. *Am J Physiol*. 1989 Sep;257(3 Pt 1):G334-43.

Streeper RS, Svitek CA, Chapman S, Greenbaum LE, Taub R, O'Brien RM. A multicomponent insulin response sequence mediates a strong repression of mouse glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin. *J Biol Chem*. 1997 May 2;272(18):11698-701.

Stümpel F, Burcelin R, Jungermann K, Thorens B. Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11330-5. Epub 2001 Sep 18.

Sugden MC, Holness MJ, Palmer TN. Fuel selection and carbon flux during the starved-to-fed transition. *Biochem J*. 1989 Oct 15;263(2):313-23.

Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG (1994) A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 14(11): 7340-51.

Suh E, Traber PG (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 16(2): 619-25.

Sundaram U, Coon S, Wisel S, West AB. Corticosteroids reverse the inhibition of Na-glucose cotransport in the chronically inflamed rabbit ileum. *Am J Physiol*. 1999 Jan;276(1 Pt 1):G211-8.

T

Tabata K, Johnson LR. Mechanism of induction of mucosal ornithine decarboxylase by food. *Am J Physiol*. 1986 Sep;251(3 Pt 1):G370-4.

- Tarachai P, Yamauchi K. Effects of luminal nutrient absorption, intraluminal physical stimulation, and intravenous parenteral alimentation on the recovery responses of duodenal villus morphology following feed withdrawal in chickens. *Poult Sci.* 2000 Nov;79(11):1578-85.
- Terada T, Sawada K, Saito H, Hashimoto Y, Inui K. Functional characteristics of basolateral peptide transporter in the human intestinal cell line Caco-2. *Am J Physiol.* 1999 Jun;276(6 Pt 1):G1435-41.
- Thamotharan M, Bawani SZ, Zhou X, Adibi SA. Hormonal regulation of oligopeptide transporter pept-1 in a human intestinal cell line. *Am J Physiol.* 1999a Apr;276(4 Pt 1):C821-6.
- Thamotharan M, Bawani SZ, Zhou X, Adibi SA. Functional and molecular expression of intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) after a brief fast. *Metabolism* 1999b Jun; 48(6): 681-4.
- Thiesen A, Wild GE, Keelan M, Clandinin MT, Agellon LB, Thomson AB. Locally and systemically active glucocorticosteroids modify intestinal absorption of lipids in rats. *Lipids.* 2002 Feb;37(2):159-66.
- Thiesen A, Wild GE, Tappenden KA, Drozdowski L, Keelan M, Thomson BK, McBurney MI, Clandinin MT, Thomson AB. The locally acting glucocorticosteroid budesonide enhances intestinal sugar uptake following intestinal resection in rats. *Gut.* 2003a Feb;52(2):252-9.
- Thiesen A, Keelan M, Wild GE, Clandinin MT, Thomson AB. Stimulating effect of glucocorticosteroids on intestinal fructose transport in rats is increased by feeding a saturated fatty acid diet. *Dig Dis Sci.* 2003b Nov;48(11):2196-206.
- Thiesen AL, Tappenden KA, McBurney MI, Clandinin MT, Keelan M, Thomson BK, Wild GE, Thomson AB. Dietary lipids alter the effect of steroids on the transport of glucose after intestinal resection: Part I. Phenotypic changes and expression of transporters. *J Pediatr Surg.* 2003c Feb;38(2):150-60.
- Thiesen A, Keelan M, Wild G, Clandinin MT, Agellon LB, Thomson AB. Effect of steroids on intestinal lipid uptake in rats is enhanced by a saturated fatty acid diet. *Cell and molecular biology collaborative network in gastrointestinal physiology. Digestion.* 2003d;68(2-3):109-18. Epub 2003 Nov 07.
- Thomson AB, Keelan M, Clandinin MT, Walker K. Dietary fat selectively alters transport properties of rat jejunum. *J Clin Invest.* 1986 Jan;77(1):279-88.
- Thouzeau C, Le Maho Y, Larue-Achagiotis C. Refeeding in fasted rats: dietary self-selection according to metabolic status. *Physiol Behav.* 1995 Dec;58(6):1051-8.
- Tordjman J, Khazen W, Antoine B, Chauvet G, Quette J, Fouque F, Beale EG, Benelli C, Forest C. Regulation of glyceroneogenesis and phosphoenolpyruvate carboxykinase by fatty acids, retinoic acids and thiazolidinediones: potential relevance to type 2 diabetes. *Biochimie.* 2003 Dec;85(12):1213-8.

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 21; 245(4915): 301-5.

Tso P, Balint JA. Formation and transport of chylomicrons by enterocytes to the lymphatics. *Am J Physiol*. 1986 Jun;250(6 Pt 1):G715-26.

Tutton PJ, Helme RD. The influence of adrenoreceptor activity on crypt cell proliferation in the rat jejunum. *Cell Tissue Kinet*. 1974 Mar;7(2):125-36.

U

Uda K, Tsujikawa T, Ihara T, Fujiyama Y, Bamba T. Luminal polyamines upregulate transmembrane glucose transport in the rat small intestine. *J Gastroenterol*. 2002;37(6):434-41.

V

Van den Bosch H, Postema NM, de Haas GH, van Deenen LL. On the positional specificity of phospholipase A from pancreas. *Biochim Biophys Acta*. 1965 Jun 1;98(3):657-9.

Verger R, Aoubala M, Carriere F, Ransac S, Dupuis L, De Caro J, Ferrato F, Douchet I, Laugier R, De Caro A. Regulation of lumen fat digestion: enzymic aspects. *Proc Nutr Soc*. 1996 Mar;55(1B):5-18.

Verrey F, Meier C, Rossier G, Kuhn LC. Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch*. 2000 Aug;440(4):503-12.

Villa M, Menard D, Semenza G, Mantei N. The expression of lactase enzymatic activity and mRNA in human fetal jejunum. Effect of organ culture and of treatment with hydrocortisone. *FEBS Lett*. 1992 Apr 20;301(2):202-6.

Voice MW, Webster AP, Burchell A. The in vivo regulation of liver and kidney glucose-6-phosphatase by dexamethasone. *Horm Metab Res*. 1997 Mar;29(3):97-100.

W

Wagner CA, Lang F, Broer S. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001 Oct;281(4):C1077-93.

Waheed AA, Gupta PD. Changes in structural and functional properties of rat intestinal brush border membrane during starvation. *Life Sci* 1997, 61: 2425-2433.

Waheed AA, Yasuzumi F, Gupta PD. Lipid and fatty acid composition of brush border membrane of rat intestine during starvation. *Lipids*. 1998 Nov;33(11):1093-7.

Wang Y, Harvey CB, Hollox EJ, Phillips AD, Poulter M, Clay P, Walker-Smith JA, Swallow DM. The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology*. 1998 Jun;114(6):1230-6.

Welsh FK, Farmery SM, MacLennan K, Sheridan MB, Barclay GR, Guillou PJ, Reynolds JV. Gut barrier function in malnourished patients. *Gut*. 1998 Mar;42(3):396-401.

Wenzel U, Meissner B, Doring F, Daniel H. PEPT1-mediated uptake of dipeptides enhances the intestinal absorption of amino acids via transport system b(0,+). *J Cell Physiol*. 2001 Feb;186(2):251-9.

Werder M., Han C.H., Wehrli E., Bimmler D., Schulthess G., Hauser H. Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochemistry* 2001, 40: 11643-11650.

Westcarr S., Farshori P., Wyche J., Anderson W.A. Apoptosis and differentiation in the crypt-villus unit of the rat small intestine. *J Submicrosc Cythol Pathol* 1999, 31: 15-30.

Wilde SW, Kilberg MS. Glutamine transport by basolateral plasma-membrane vesicles prepared from rabbit intestine. *Biochem J*. 1991 Aug 1;277 (Pt 3):687-91.

Williamson RC. Intestinal adaptation (first of two parts). Structural, functional and cytokinetic changes. *N Engl J Med*. 1978 Jun 22;298(25):1393-402.

Williamson RC. Intestinal adaptation (second of two parts). Mechanisms of control. *N Engl J Med*. 1978 Jun 29;298(26):1444-50.

Wilson J.W., Potten C. Immunocytochemical localisation of BAX and BAD in the normal and bcl-2 null gastrointestinal tract. *Apoptosis* 1997, 1: 183-190.

Woodward CJH, Emery PW. Energy balance in rats given chronic hormone treatment. 2. Effects of corticosterone. *Brit. J. Nutr.* 1989, 61: 445-452.

Wormmeester L, Sanchez de Medina F, Kokke F, Tse CM, Khurana S, Bowser J, Cohen ME, Donowitz M. Quantitative contribution of NHE2 and NHE3 to rabbit ileal brush-border Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 1):C1261-72.

Y

Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami K, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*. 2003 Jun 5;38(5):701-13.

Yeaman SJ. Hormone-sensitive lipase--a multipurpose enzyme in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Apr 9;1052(1):128-32.

Yoshizawa F, Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Effect of dietary protein on translation initiation in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1998 Nov; 275: E814 - 820.

Young A, Levin RJ. Diarrhoea of famine and malnutrition: investigations using a rat model. 1. Jejunal hypersecretion induced by starvation. *Gut*. 1990a Jan;31(1):43-53.

Young A, Levin RJ. Diarrhoea of famine and malnutrition: investigations using a rat model. 2. Ileal hypersecretion induced by starvation. *Gut*. 1990b Feb;31(2):162-9.

Z

Ziegler TR, Estivariz CF, Jonas CR, Gu LH, Jones DP, Leader LM. Interactions between nutrients and peptide growth factors in intestinal growth, repair, and function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1999 Nov-Dec;23(6 Suppl):S174-83.

Ziegler TR, Bazargan N, Leader LM, Martindale RG. Glutamine and the gastrointestinal tract. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2000 Sep;3(5):355-62.

Ziegler TR, Evans ME, Fernandez-Estivariz C, Jones DP. Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function. *Annu Rev Nutr*. 2003;23:229-61. Epub 2003 Feb 26.

Annexes

ANNEXES

1. Communications et posters

*: orateur

Consortium des Microscopies. Novembre 2001, Strasbourg, France.

Habold, C.* Le microscope électronique à balayage environnemental en biologie. Présentation orale et poster.

Séminaires : mai 2003, INSERM U449, Lyon, France, et INSERM U381, Strasbourg, France.

Habold, C.*, Foltzer-Jourdainne, C., Lignot J-H. Effets du jeûne sur l'intestin grêle en fonction des réserves énergétiques. Présentation orale.

Réunion annuelle de la Society for Experimental Biology: 31 mars-4 avril 2003, Southampton, UK.

Habold, C., Chevalier, C., Lignot, J.-H*. Functional restoration of rat intestinal mucosa before and after refeeding. Présentation orale.

Habold, C., Chevalier, C., Lignot, J.-H. Apoptosis, cell proliferation and migration in rat small intestine during the metabolic adjustments occurring through fasting and after refeeding. Poster.

Réunion annuelle de la Society for Experimental Biology: 29 mars-2 avril 2004, Edinburgh, UK.

Habold, C., Foltzer-Jourdainne, C., Arbiol, C., Le Maho, Y., Lignot, J-H. Does long-term fasting induce intestinal apoptosis? Poster.

Helmstetter, C., **Habold, C.**, Arbiol, C., Secor, S., Lignot, J-H. Cellular events and apoptosis in the intestinal mucosa of the Burmese python. Poster.

2. Articles

Habold, C., Dunel-Erb, S., Chevalier, C., Laurent, P., Lignot, J-H. (2003). Environmental scanning electron microscope (ESEM) in biology: case study of the intestinal mucosa during fasting and refeeding in rat. **Micron**, 34/8 : 373-379.

Habold, C., Chevalier, C., Dunel-Erb, S., Foltzer-Jourdainne, C., Le Maho, Y., Lignot, J-H. (2004). Effects of fasting and refeeding on jejunal morphology and cellular activity in rats according to body stores depletion. **Scand J Gastroenterol**, Jun ; 39(6): 531-9.

Habold, C., Foltzer-Jourdainne, C., Arbiol, C., Le Maho, Y., Lignot J-H. Intestinal apoptosis according to metabolic status in fasted and refed rats. Soumis.

Habold, C., Foltzer-Jourdainne, C., Le Maho, Y., Lignot J-H., Oudart, H. Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. Soumis.

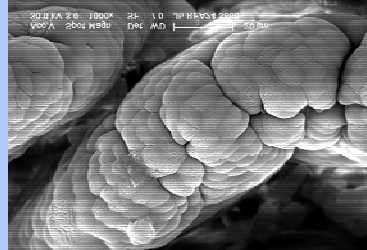
Schaeffer, C., **Habold, C.,** Martin, E., Kedinger, M., Foltzer-Jourdainne, C. Cytokine gene expression in rat colon during postnatal development. En préparation.

MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE ENVIRONNEMENTALE (ESEM)

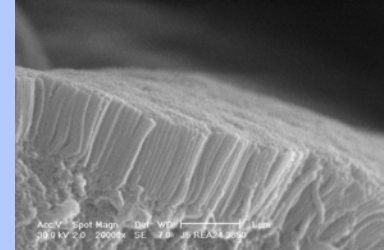
Caroline Habold, Suzanne Dunel-Erb, Claudine Chevalier, Pierre Laurent, Yvon Le Maho
Centre d'Ecologie et Physiologie Energétiques. CNRS. 23, Rue Becquerel. 67087 Strasbourg Cedex 2

L'ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope) est avant tout un microscope électronique à balayage conventionnel (SEM).

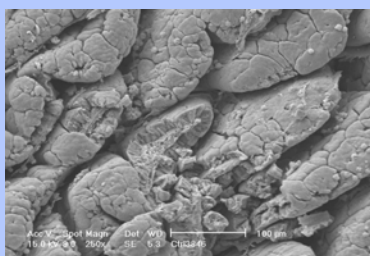
En microscopie électronique à balayage, un faisceau primaire d'électrons parcourt la surface de l'échantillon à observer. En chacun des points frappés par le faisceau, des électrons secondaires sont émis. Les trajectoires de ces électrons secondaires sont analysées électroniquement, et l'image de l'échantillon est ainsi reconstituée sur un écran.



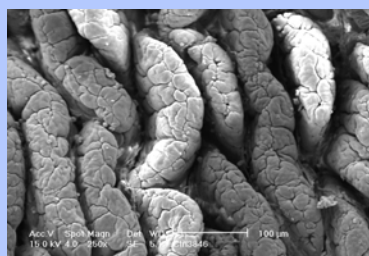
Sommet de villosité intestinale, SEM



Bordure en brosse d'entérocyte, SEM



Villosités intestinales détériorées, SEM



Phénomènes de charge, SEM

En SEM, pour que les électrons ne soient pas déviés, l'intérieur du microscope, y compris la chambre de l'échantillon, doit être placé en **haut vide**. Ceci implique une préparation particulière des objets : fixation, déshydratation, métallisation.

Ce traitement est long, délicat, et risque de détériorer les échantillons. En outre, on observe souvent des phénomènes de charge liés à la métallisation.

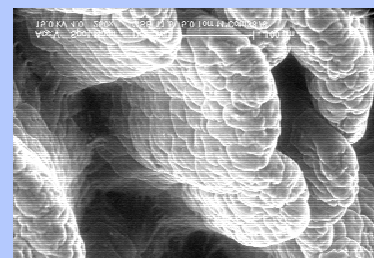
L'ESEM ne présente pas ces inconvénients.

Les performances de l'ESEM :

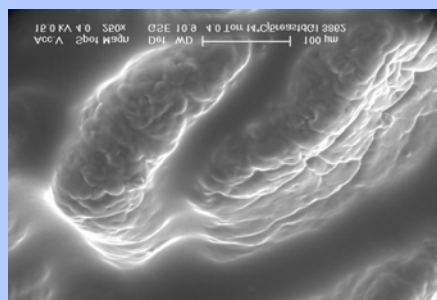
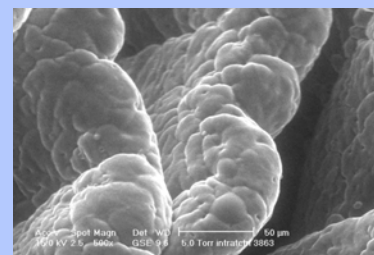
1) Grâce à un système de pompage différentiel, l'ESEM crée et maintient une pression comprise entre 1 et 20 Torr dans la chambre de l'échantillon. On s'affranchit ainsi de la contrainte de haut vide, c'est-à-dire que les échantillons ne nécessitent **pas de préparation préalable**. Ils sont observés dans leur état naturel: frais, vivants, fragiles, humides, sales, huileux... Ils restent par conséquent intacts, et on n'observe pas les artefacts liés à la métallisation.

2) L'ESEM permet de modifier les paramètres de pression (jusqu'à 50 Torr), température (de 0 à 1500 °C), humidité relative, et composition gazeuse, dans la chambre de l'objet. Il offre donc de nombreuses possibilités d'étude d'un spécimen.

3) L'ESEM est doté d'un détecteur insensible à la lumière. Ceci permet d'observer un objet quelle que soit la lumière qu'il émet.



Villosités intestinales, ESEM



Echantillon humide de muqueuse intestinale, ESEM

Et ses limites :

Elles sont liées à la fraîcheur de l'échantillon, surtout s'il s'agit d'un objet biologique. Ainsi, l'humidité d'un objet limite fortement le grossissement. D'autre part, un échantillon vivant est dynamique, mobile, ce qui rend l'observation, et en particulier la mise au point, parfois délicate. Enfin, l'observation d'un échantillon biologique doit être immédiate et rapide. Elle ne peut être renouvelée sur cet échantillon.

Photographies : applications de l'ESEM au CEPE (villosités de la muqueuse intestinale de rats soumis à divers régimes alimentaires).

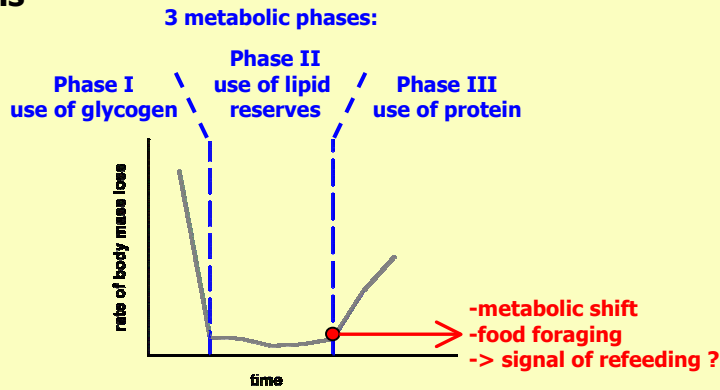
Changes in jejunal structure according to body store depletion

Caroline Habold & Jean-Hervé Lignot

Cepe-Cnrs Strasbourg France

Background & aims

Fasting -> changes in body composition:



Fasting -> jejunal mucosal atrophy

The effects of a short fast (4-5 days) on jejunal morphology are well-known:

- ceasing of mitosis
- ceasing of cell migration
- increase in apoptosis
- as a consequence: **shortening of villi**

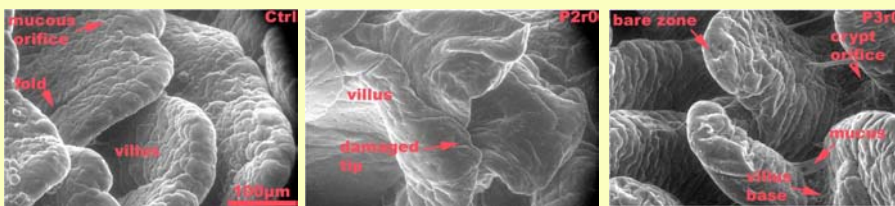
What are the effects of a **prolonged** fast ?

Is there a relation between metabolic phases and jejunal atrophy ?

Procedure

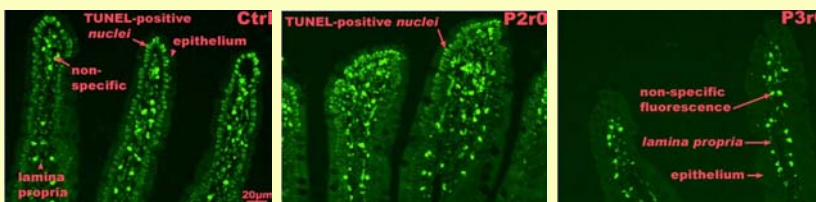
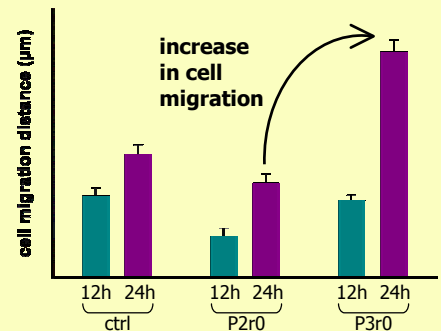
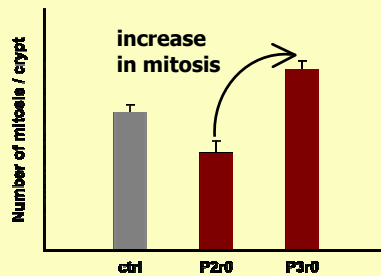
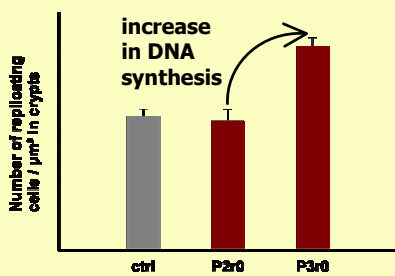
Jejunal cellular dynamics were studied in control (ctrl), phase II (P2r0) and phase III (P3r0) fasting rats. Pieces of jejunum were processed for light and environmental scanning electron microscopy (ESEM). Immunohistochemistry was used for detection of replicating cells (BrdU labelled) and apoptotic cells (TUNEL-positive).

Observations



Fasting induced thinning and shortening of the villi. These phenomena were worse in phase III, so that villus bases and crypt orifices became apparent.

However, in phase III,



ceasing of apoptosis

Conclusions

Phase II: phase of economy -body proteins are efficiently spared
-jejunal cellular proliferation is stopped

Phase III: anticipation of refeeding -rise in locomotor activity, food foraging
-use of structural protein
-high jejunal cell proliferation rate and preservation of mature enterocytes to optimise absorption when food is available -> could be related to an endogenous signal of refeeding.

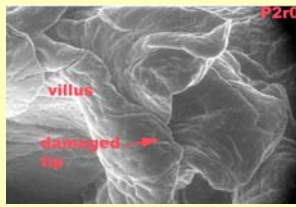
Aim

How is jejunal mucosa restored after refeeding following phase II and phase III ?

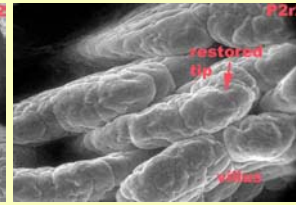
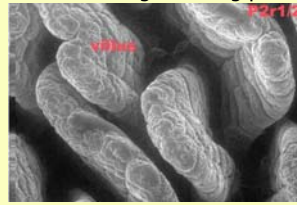
Procedure

Animals were refed 1/2h, 2h, 6h and 24h following phase II, and 2h, 6h and 24h following phase III.

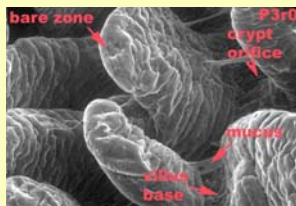
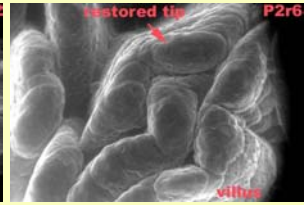
Observations



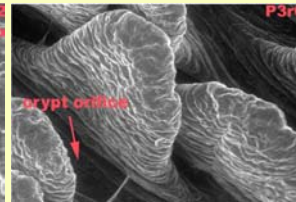
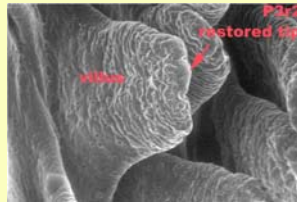
Villi thickened as early as 30min after refeeding following phase II



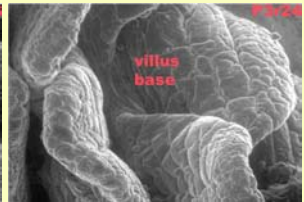
After P2r6, villi were similar as in control animals



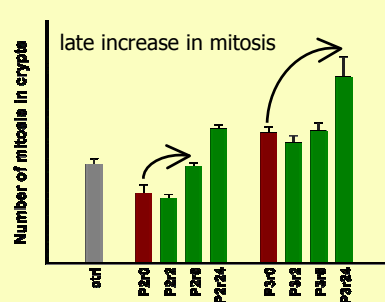
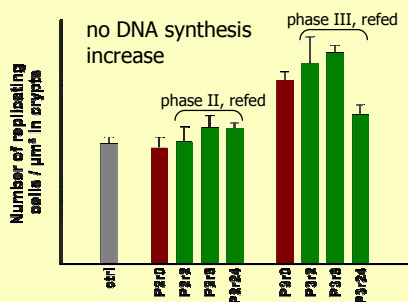
Villi were still thin and short after P3r2 and P3r6; tips seemed to be restored



Villi appeared thickened after P3r24



Mechanisms involved ?

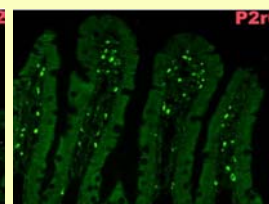
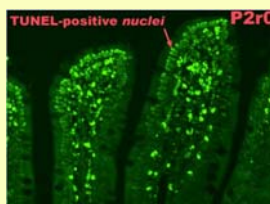


Cellular proliferation is not involved in the structural restoration observed at the beginning of refeeding.

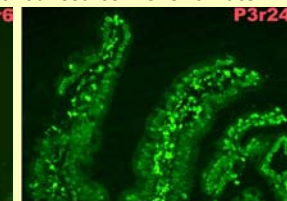
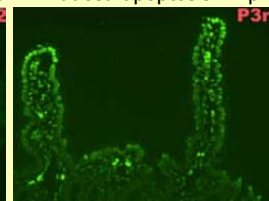
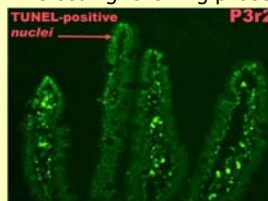
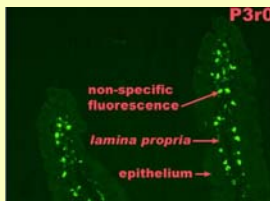
Role of mechanical effects (extension of the *lamina propria*, rehydration) ?

apoptosis ceased in the first hours of refeeding following phase II -> preservation of mature cells to optimise absorption

apoptosis after 24h refeeding -> normal cell renewal



refeeding following phase III induced apoptosis -> pronounced cell renewal rate



Conclusions

Jejunal **structural** restoration could be rapidly observed after food ingestion. Refeeding following phase II induces disappearance of apoptosis and cell preservation, but does not increase cell proliferation rate. After refeeding following phase III, apoptosis is induced and cell proliferation (DNA synthesis and mitosis) is still pronounced.

Cell renewal is enhanced during refeeding following phase III. As a consequence, jejunal cellular proliferation is complete after 3 days of refeeding following phase II and III, despite the larger morphological atrophy in phase III.

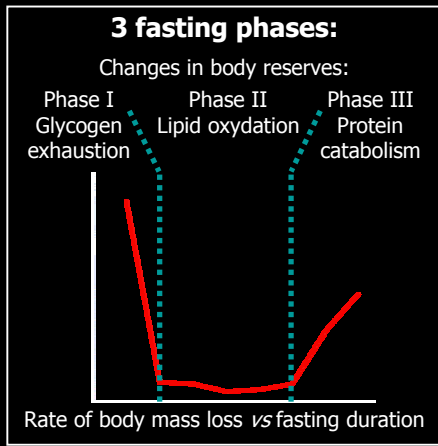
Does long-term fasting induce intestinal apoptosis?

Caroline Habold, Charlotte Foltzer-Jourdainne, Christine Arbiol, Yvon Le Maho, Jean-Hervé Lignot

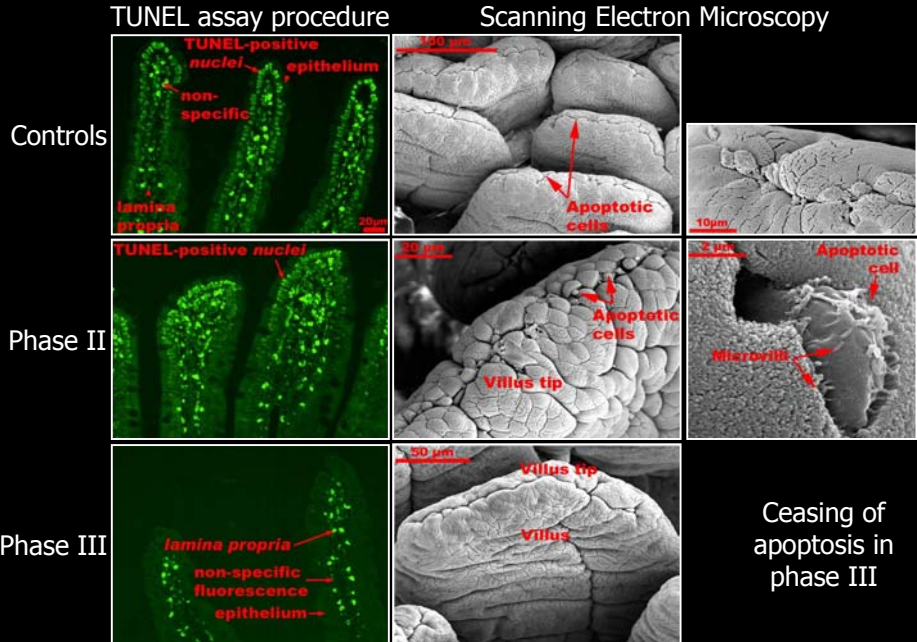
Cepe-Cnrs Strasbourg France



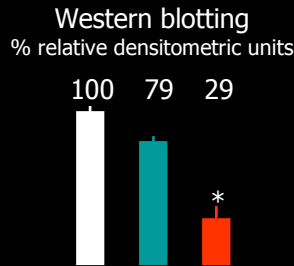
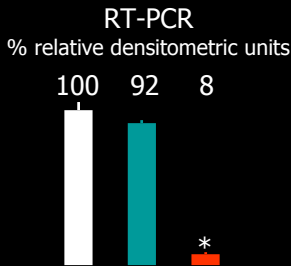
Intestinal apoptosis has been studied in the jejunum of fasted rats according to body fuel depletion and hormonal changes:



Also, phase III: 370-fold increased plasma corticosterone level

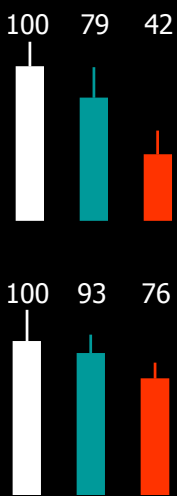


Gene and protein expressions of proinflammatory cytokines known to trigger jejunal epithelial apoptosis:



Legend: Control (white), Phase II (teal), Phase III (orange)

Abbreviations:
 TGFβ1: Transforming Growth Factor β1, TNFα: Tumor Necrosis Factor α, CDX2: Caudal-related homeodomain protein, RT-PCR: Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction

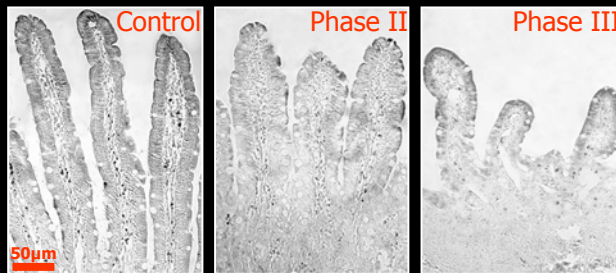


TNFα

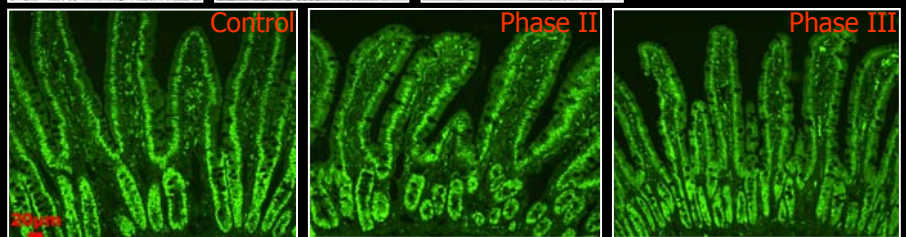
TGFβ1

CDX2

Immunohistochemistry



Decrease in pro-apoptotic cytokines gene expression and protein level



Phase III → Rise in plasma corticosterone level → Decrease in cytokines gene expression and protein level
 → Ceasing of apoptosis

So, absorptive cells are preserved in the late phase III in order to absorb nutrients as soon as food is available.