



HAL
open science

Impact de la structure de la matière grasse sur l'absorption et le devenir métabolique des lipides et des endotoxines chez l'Homme normo-pondéré ou obèse

Cécile Vors

► **To cite this version:**

Cécile Vors. Impact de la structure de la matière grasse sur l'absorption et le devenir métabolique des lipides et des endotoxines chez l'Homme normo-pondéré ou obèse. Sciences agricoles. INSA de Lyon, 2012. Français. NNT : 2012ISAL0091 . tel-01074106

HAL Id: tel-01074106

<https://theses.hal.science/tel-01074106v1>

Submitted on 13 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée devant

L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

Pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE

Spécialité Biochimie

par

VORS Cécile

**Impact de la structure de la matière grasse sur l'absorption et
le devenir métabolique des lipides et des endotoxines
chez l'homme normo-pondéré ou obèse**

Soutenue publiquement le **12 octobre 2012**

Directeur de thèse : **Dr Marie-Caroline MICHALSKI**

Membres du jury :

Dr Hubert VIDAL, Directeur de Recherche INSERM, Lyon	Président
Pr Nathalie DELZENNE, Professeur, Université de Louvain	Rapporteur
Pr Philippe LEGRAND, Professeur, Université de Rennes	Rapporteur
Dr Béatrice MORIO, Directeur de Recherche INRA, Clermont-Ferrand	Examineur
Pr Martine LAVILLE, Professeur, Université de Lyon	Examineur
Dr Constance BOYER, Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, Paris	Examineur
Dr Marie-Caroline MICHALSKI, Chargé de Recherche INRA, Lyon	Directeur

TABLE DES MATIERES

RESUME.....	1
LISTE DES FIGURES.....	2
LISTE DES TABLEAUX.....	4
LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
PUBLICATIONS, PARTENARIAT ET PRIX.....	7
INTRODUCTION.....	10
CHAPITRE 1 – CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE	12
1. OBESITE, CHRONIQUE D’UNE PANDEMIE ANNONCEE	12
1.1. Epidémiologie de l’obésité	13
1.1.1. Définition.....	13
1.1.2. Prévalence dans le monde et en France.....	14
1.2. Etiologie de la maladie et comorbidités.....	15
1.2.1. Déséquilibre de la balance énergétique.....	15
1.2.2. Facteurs obésogènes.....	17
1.2.3. Complications métaboliques associées.....	18
1.3. Traitement de l’obésité	19
2. LES LIPIDES ALIMENTAIRES.....	22
2.1. Définition et classification.....	23
2.2. Structure des lipides alimentaires.....	25
2.2.1. Structure moléculaire.....	25
2.2.2. Structure supramoléculaire.....	26
a) Propriétés thermiques et structures cristallines des triglycérides.....	26
b) Structures micellaires et lamellaires des lipides polaires en milieu aqueux.....	27
2.2.3. Organisation des lipides dans les aliments.....	28
3. L’INTESTIN : ORGANE COMPLEXE, LIEU D’ABSORPTION DES LIPIDES ET D’INTERACTION AVEC LE MICROBIOTE	31
3.1. Au cœur d’un système digestif.....	32
3.1.1. Organisation et physiologie du système digestif.....	32
3.1.2. Digestion des lipides alimentaires.....	34
a) Hydrolyses successives.....	34

b) Micellisation des produits d'hydrolyse	36
c) Importance des différents niveaux de structure de la matière grasse	36
3.2. Absorption intestinale des lipides alimentaires	40
3.2.1. Captage et trafic entérocytaires des acides gras	40
3.2.2. Synthèse et sécrétion des chylomicrons	42
3.2.3. Stockage entérocytaire des lipides	43
3.2.4. Importance de la structure lipidique	43
3.2.5. Modèle d'absorption intestinale in vitro : les cellules Caco-2	45
3.3. Microbiote intestinal résident	47
3.3.1. Composition et diversité	47
3.3.2. Fonctions du microbiote	49
3.3.3. Endotoxines du microbiote : structure et absorption intestinale	51
4. DEVENIR POST-ABSORPTIF DES LIPIDES INGERES : LIPEMIE POSTPRANDIALE ET DISTRIBUTION DES LIPIDES	54
4.1. Lipémie postprandiale et sa modulation nutritionnelle.....	55
4.1.1. Lipoprotéines riches en triglycérides	55
a) Structure et composition	55
b) Voies métaboliques exogène et endogène	56
c) Lipolyse intravasculaire et sa régulation	57
4.1.2. Effets de la quantité et de la qualité des lipides	60
4.1.3. Impact de la structure des lipides	62
4.1.4. Autres facteurs nutritionnels	64
4.2. Répartition postprandiale des lipides alimentaires.....	65
4.2.1. Distribution des lipides : oxydation vs stockage	65
4.2.2. Phénomène de « spillover »	68
5. ENDOTOXEMIE ET INFLAMMATION ASSOCIEES COMME NOUVEAUX FACTEURS DE RISQUE METABOLIQUE LIES A LA PHASE POSTPRANDIALE	70
5.1. Composante inflammatoire du risque métabolique.....	71
5.1.1. Obésité et inflammation à bas bruit	71
5.1.2. Régimes hyperlipidiques et inflammation postprandiale	72
5.1.3. Effets modulateurs des lipides alimentaires sur l'inflammation métabolique	75
5.2. Nouvelle composante inflammatoire associée au microbiote : l'endotoxémie.....	77
5.2.1. Altérations du microbiote et maladies métaboliques	77
5.2.2. Transport plasmatique d'endotoxines bactériennes et cascade inflammatoire	79
5.2.3. Régimes hyperlipidiques, obésité et endotoxémie métabolique	81

CHAPITRE 2 – HYPOTHESES ET OBJECTIFS	84
CHAPITRE 3 – MATERIELS ET METHODES	86
1. ETUDES CLINIQUES	86
1.1. Etude LIPINFLOX	87
1.1.1. Plan d'étude et objectifs	87
1.1.2. Les sujets	88
1.1.3. Repas tests	91
1.1.4. Journées d'exploration métabolique	93
1.2. Etude BIBOP	94
1.2.1. Plan d'étude et objectifs	94
1.2.2. Technique chirurgicale du by-pass gastrique	95
1.2.3. Les patients	95
1.2.4. Repas test et journées d'exploration métabolique	96
1.3. Méthodes	97
1.3.1. Caractérisation physico-chimique de la matière grasse test	97
1.3.2. Inclusion des sujets	100
1.3.3. Mesures anthropométriques	101
1.3.4. Dosages bio/immuno-chimiques	101
1.3.5. Séparation des lipoprotéines	102
1.3.6. Calorimétrie indirecte	103
1.3.7. Breath test	103
1.3.8. Analyses isotopiques	104
1.3.9. Granulométrie des lipoprotéines	109
1.3.10. Mesure de l'endotoxémie (méthode LAL)	110
1.3.11. Analyses génomiques par RT-qPCR	111
1.3.12. Extraction des globules blancs et dosage de NF- κ B	113
1.4. Calculs	113
1.4.1. Paramètres de cinétique : t_{max} , C_{max} , aires sous courbes	113
1.4.2. Oxydation des substrats énergétiques	114
1.4.3. Oxydation des lipides exogènes	114
1.4.4. Enrichissements isotopiques	115
2. ETUDE COMPLEMENTAIRE <i>IN VITRO</i> DE L'EFFET DE LA STRUCTURE DES EMULSIONS	117
2.1. Plan d'étude et objectifs	118
2.2. Méthodes	119

2.2.1.	Formulation et réalisation des émulsions alimentaires	119
2.2.2.	Digestion in vitro des émulsions	119
2.2.3.	Culture cellulaire de Caco-2 et traitements	120
2.2.4.	Analyses lipidiques	121
2.2.5.	Analyses granulométriques	121
2.2.6.	Analyses génomiques par RT-qPCR	122
3.	ANALYSES STATISTIQUES	123
3.1.	Etude Lipinflux	124
3.2.	Etude Bibop	125
3.3.	Etude complémentaire <i>in vitro</i>	126
CHAPITRE 4 – RESULTATS		127
1.	MODULATION DU METABOLISME LIPIDIQUE PAR LA STRUCTURE EMULSIONNEE OU NON DE LA MATIERE GRASSE	127
1.1.	Evaluation des différences de métabolisme postprandial des lipides non émulsionnés entre des sujets obèses et normo-pondérés (étude Lipinflux)	128
1.1.1.	Introduction	128
1.1.2.	Caractéristiques des sujets et des repas tests	129
1.1.3.	Résultats	129
1.1.4.	Discussion	132
1.2.	Modulation de l'absorption et du devenir métabolique des lipides par la structure émulsionnée (étude Lipinflux)	135
1.2.1.	Introduction	135
1.2.2.	Article	137
1.2.3.	Discussion	138
1.3.	Etude <i>in vitro</i> de la modulation de la digestion et de l'absorption entérocytaire des lipides par différentes structures émulsionnées	142
1.3.1.	Introduction	142
1.3.2.	Article	143
1.3.3.	Discussion	144
2.	ENDOTOXEMIE METABOLIQUE ASSOCIEE A L'ABSORPTION LIPIDIQUE	149
2.1.	Endotoxémie au cours de l'absorption de différentes quantités et structures de lipides (étude lipinflux)	150
2.1.1.	Introduction	150
2.1.2.	Résultats	150
2.1.3.	Discussion	152

2.2. Effet d'une diminution de l'absorption intestinale via un by-pass gastrique (étude Bibop).....	154
2.2.1. Introduction	154
2.2.2. Résultats	156
2.2.3. Discussion	158
2.3. Perspectives sur l'impact métabolique de l'endotoxémie postprandiale : modifications des transporteurs de LPS en lien avec l'inflammation (études Lipinflox et Bibop).....	160
2.3.1. Introduction	160
2.3.2. Résultats	160
2.3.3. Discussion	162
CHAPITRE 5 - DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	164
BIBLIOGRAPHIE	170
ANNEXES	194

RESUME

L'altération du métabolisme postprandial des lipides et l'inflammation chronique associée apparaissent comme des éléments majeurs de la physiopathologie de l'obésité. L'implication de l'absorption intestinale d'endotoxines bactériennes du microbiote au cours de la digestion des lipides a été mise en évidence. Cependant la modulation de ces phénomènes par différentes quantités de lipides différemment structurés reste mal caractérisée, notamment chez les obèses.

Nous avons mis en place un protocole clinique, en cross-over randomisé, visant à étudier chez des sujets normo-pondérés et obèses les conséquences de la digestion de matière grasse consommée, soit sous forme tartinée en différentes quantités (10 g ou 40 g), soit sous forme finement émulsionnée (40 g) sur le métabolisme postprandial des lipides et des endotoxines. Nous avons ainsi mis en évidence que l'augmentation plasmatique des chylomicrons, suite à une augmentation de la quantité de matière grasse ingérée, était plus précoce et plus importante chez les normo-pondérés que chez les sujets obèses, avec la sécrétion de plus gros chylomicrons suite à 40 g. Lorsque 40 g de matière grasse est émulsionnée, nous montrons qu'elle aboutit à un pic de triglycérides des chylomicrons plus précoce et plus élevé, reflétant une absorption facilitée des lipides, et de manière plus marquée chez l'obèse. Nous montrons aussi que cet état émulsionné aboutit à une β -oxydation plus élevée des lipides exogènes sur la journée, sans différence de perte fécale. Une endotoxémie postprandiale est également observée suite aux différents repas. L'accumulation postprandiale d'endotoxines, notamment présentes dans les chylomicrons, augmente avec la quantité de matière grasse tartinée en corrélation avec l'aire sous courbe des chylomicrons chez les obèses. En complément, l'absorption lipidique *in vitro* par des cellules Caco-2 était plus importante suite à l'incubation de milieux de lipolyse d'émulsions stabilisées par du caséinate que de la lécithine. Enfin, un test de digestion a été réalisé avant et après une chirurgie de by-pass gastrique pour identifier si une diminution drastique de l'absorption lipidique modifiait l'endotoxémie. Suite à l'opération, les patients sont davantage exposés aux endotoxines après la prise d'une émulsion au petit-déjeuner. En revanche, la LBP, protéine de transport des endotoxines proinflammatoire, diminue significativement à jeun et en postprandial suite à l'opération.

L'ensemble de ces travaux démontrent qu'en plus des effets de la quantité de lipides ingérée sur la lipémie et l'absorption d'endotoxines associée, la structure de la matière grasse joue un rôle important dans la modulation du devenir métabolique des acides gras. La structuration des lipides alimentaires pourrait donc être spécifiquement adaptée afin d'optimiser le métabolisme lipidique postprandial, notamment chez des personnes obèses.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Balance des apports et des dépenses énergétiques

Figure 2. Principales techniques de chirurgie bariatrique

Figure 3. Principales sources d'acides gras alimentaires et leurs structures moléculaires

Figure 4. Principales structures supramoléculaires de lipides alimentaires

Figure 5. Schéma d'émulsions de type huile-dans-eau (H/E) et eau-dans-huile (E/H)

Figure 6. Appareil digestif humain

Figure 7. Hydrolyses successives d'un triglycéride alimentaire

Figure 8. Captage, devenir intra-entérocytaire des acides gras et synthèse des chylomicrons

Figure 9. Schéma du tractus gastro-intestinal et son microbiote résident

Figure 10. Phyla bactériens du microbiote gastro-intestinal humain et quelques exemples de groupes/genres bactériens qui les composent

Figure 11. Structures d'une paroi de bactérie Gram négatif et d'un lipopolysaccharide bactérien

Figure 12. Structure générale d'une lipoprotéine

Figure 13. Les différentes voies métaboliques des lipoprotéines humaines

Figure 14. Cascade pro-inflammatoire induite par les lipopolysaccharides (LPS)

Figure 15. Problématiques étudiées au moyen des différentes études menées au cours de la thèse

Figure 16. Déroulement des protocoles cliniques Lipinflox et Bibop

Figure 17. Déroulement d'une journée d'exploration Lipinflox

Figure 18. Déroulement d'une journée d'exploration Bibop

Figure 19. Traitements des échantillons lipidiques et analyses par spectrométrie de masse

Figure 20. Méthodologie de l'étude complémentaire *in vitro*

Figure 21. Cinétiques postprandiales après consommation de 10 g (lignes pointillées) ou 40 g (lignes pleines) de matière grasse : delta TG FRCM (mM) chez les normo-pondérés (A) et chez les obèses (B), et AUCi correspondantes en insert ; taille des FRCM (nm) chez les normo-pondérés (C) et chez les obèses (D) ; ApoB48 (mg/M) chez les normo-pondérés (E) et chez les obèses (F)

Figure 22. Cinétiques postprandiales après consommation de 10 g (lignes pointillées) ou 40 g (lignes pleines) de matière grasse : AGNE (μ M) chez les normo-pondérés (A) et chez les obèses (B) ; insuline (mUI/L) chez les normo-pondérés (C) et chez les obèses (D)

Figure 23. Pertes fécales en 13 C-acide palmitique (barres pleines) et 13 C-acide oléique (barres rayées) après consommation de 10 g ou 40 g de matière grasse tartinée chez les normo-pondérés (blanc) et

chez les obèses (gris) (A) ; parts respectives des lipides exogènes et totaux oxydés suite à 10 g ou 40 g de matière grasse tartinée, pour les deux groupes de sujets (B)

Figure 24. Paramètres de cinétique (C_{max} et T_{max}) après consommation de 10 g tartine (barres blanches), 40 g tartine (barres noires) ou 40g émulsion (barre rayées) : concentrations en LPS, à jeun et maximale sur la période postprandiale 30-240 min, chez les normo-pondérés (A) et chez les obèses (B) ; temps d'apparition de la concentration maximale en LPS chez les deux groupes de sujets (C)

Figure 25. Cinétiques postprandiales d'endotoxémie, après consommation de 10 g tartine (carrés, lignes pointillées), 40 g tartine (carrés, lignes pleines) ou 40 g émulsion (ronds) chez les normo-pondérés (A, C) et chez les obèses (B, D)

Figure 26. ASC incrémentales des endotoxines, après consommation de 10 g tartine (barres blanches), 40 g tartine (barres noires) ou 40 g émulsion (barres rayées) chez les normo-pondérés (A, C) et chez les obèses (B, D)

Figure 27. Teneur en endotoxines de la fraction riche en chylomicrons (FRCM) après consommation de 10 g tartine (barres blanches), 40 g tartine (barres noires) ou 40 g émulsion (barres rayées) chez les normo-pondérés (A, C) et chez les obèses (B, D)

Figure 28. Corrélations entre LPS plasmatiques et TG de la fraction riche en chylomicrons (FRCM), après consommation de 10 g tartine et 40 g tartine confondus (A) ou séparés (C), chez les sujets obèses (A, C) et les sujets normo-pondérés (B), sur la période postprandiale 0-300 min

Figure 29. Cinétiques postprandiales de glycémie (A), triglycéridémie (B), insulinémie (C), AGNE (D), et ASC correspondantes en insert, après consommation d'une émulsion à 40 g de matière grasse, avant (ronds blancs) et après (ronds noirs) by-pass (BP) gastrique

Figure 30. Concentrations en LPS à jeun et maximale sur la période 30-300 min (A), cinétiques postprandiales d'augmentation de LPS au cours des 5 premières heures (B) et ASCi de LPS correspondantes (C), après consommation d'une émulsion à 40 g de matière grasse, avant (ronds et barres blancs) et après (ronds et barres noirs) by-pass gastrique (BP)

Figure 31. Concentrations à jeun en IL-6 chez les sujets normo-pondérés, obèses modérés et obèses morbides

Figure 32. Cinétiques postprandiales de la cytokine IL-6, après consommation de 10 g tartine (carrés, lignes pointillées), 40 g tartine (carrés, lignes pleines) ou 40g émulsion (ronds) chez les sujets normo-pondérés (A, C) et les sujets obèses (B, D)

Figure 33. Concentrations à jeun en LBP (A) et sCD14 (B) chez les sujets normo-pondérés, obèses modérés et obèses morbides et corrélation entre concentrations à jeun en LBP et IL-6 plasmatiques (C), tous IMC confondus (normo-pondérés, obèses modérés et morbides).

Figure 34. Cinétiques postprandiales des transporteurs LBP (A) et sCD14 (B), après consommation d'une émulsion à 40 g de matière grasse, chez les sujets obèses, avant (ronds blancs) et après (ronds noirs) by-pass gastrique (BP) ; ASC correspondantes en insert.

Figure 35. Résumé des principaux résultats de cette thèse - études cliniques et *in vitro*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Seuils de corpulence en fonction de l'IMC d'après l'OMS

Tableau 2. Récapitulatif de l'impact des structures moléculaire et supramoléculaire des lipides sur les étapes de digestion gastrique et pancréatique

Tableau 3. Récapitulatif de l'impact des structures moléculaire et supramoléculaire des lipides sur l'étape d'absorption intestinale

Tableau 4. Caractéristiques des principales lipoprotéines plasmatiques humaines

Tableau 5. Récapitulatif de l'impact des structures moléculaire et supramoléculaire des lipides sur la lipémie postprandiale

Tableau 6. Effet de la composition des repas tests relatés dans la littérature, visant à étudier l'effet des repas hyperlipidiques sur l'inflammation postprandiale

Tableau 7. Effet de la composition des repas tests relatés dans la littérature, visant à étudier l'effet des repas hyperlipidiques sur l'endotoxémie postprandiale

Tableau 8. Composition macro-nutritionnelle du petit-déjeuner test à base de 40 g de matière grasse émulsionnée (protocole Bibop)

Tableau 9. Similarités et différences entre les méthodologies des protocoles cliniques

Tableau 10. Organisation des différents dosages et expériences dans le cadre des protocoles cliniques et *in vitro*

Tableau 11. Paramètres anthropométriques et métaboliques des sujets normo-pondérés et obèses à jeun (protocole Lipinflox)

Tableau 12. Composition macro-nutritionnelle des petits-déjeuners tests à base de 10 g ou 40 g de matière grasse tartinée (protocole Lipinflox)

Tableau 13. Paramètres anthropométriques et métaboliques à jeun avant et après by-pass (BP) gastrique

LISTE DES ABREVIATIONS

ACS : acyl-CoA synthétase
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AE : apport énergétique
AFSSA : agence française de sécurité sanitaire des aliments
AG : acide gras
AGCC : acide gras à chaîne courte
AGLC : acide gras à chaîne longue
AGMI : acide gras monoinsaturé
AGNE : acide gras non estérifié
AGPI : acide gras polyinsaturé
AGS : acide gras saturé
ALA : acide linoléique
ANC : apport nutritionnel conseillé
ANGPTL : angiopoietin-like proteins
ANSES : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation
APE : atom percent excess
Apo : apolipoprotéine
ARN : acide ribonucléique
ASC : aire sous courbe
ASCi : aire sous courbe incrémentale
BP : by-pass
CCK : cholécystokinine
CCM : chromatographie sur couche mince
CETP : cholesteryl ester transfer protein
CM : chylomicron
CMC : concentration micellaire critique
CNIEL : centre national interprofessionnel de l'économie laitière
CPG-C-SMI : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse isotopique en mode combustion
CPG-SMO : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse organique
CRNH-RA : centre de recherche en nutrition humaine – Rhône-Alpes
CRP : C-reactive protein
dARF : dietary acetate recovery factor
DGAT : diacylglycérol acyltransferase
DHA : acide docosahexaénoïque
dNTP : désoxyribonucléotides
DO : densité optique
E/H : eau/huile
EPA : acide eicosapentaénoïque
ESM : écart standard à la moyenne
FDA : food and drug administration
FRCM : fraction riche en chylomicrons
FTO : fat-mass and obesity associated
GLP-1 : glucagon-like peptide-1
H/E : huile dans eau
HDL : high density lipoprotein
HOMA : homeostasis model assessment of insulin resistance)
HPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase
HSPG : héparanes sulfates protéoglycanes
IDL : intermediate density lipoprotein
I-FABP : intestinal fatty acid binding protein

IL-6 : interleukin-6
IMC : indice de masse corporelle
INSEE : institut national de la statistique et des études économiques
LA : acide linoléique
LAL : lysat d'amœbocytes de limule
LBP : lipopolysaccharide binding protein
LDL : low density lipoprotein
LE : lait écrémé
L-FABP : liver fatty acid binding protein
LHS : lipase hormono-sensible
LPS : lipopolysaccharide
LRT : lipoprotéines riches en TG
mCD14 : membrane cluster of differentiation 14
MD2 : myeloid differentiation protein-2
MG : matière grasse
MGAT : monoacylglycérol acyltransferase
MGLA : matière grasse laitière anhydre
MICI : maladie inflammatoire chronique intestinale
MPE : mole percent excess
MR : metabolism de repos
MTP : microsomal triglyceride transfer protein
NAP : niveau d'activité physique
NF-κB : nuclear factor-kappa B
NP : normo-pondérés
OCDE : organisation de coopération et de développement économiques
OMS : organisation mondiale de la santé
PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1
PCTV : prechylomicron transport vesicule
PHRC : programme hospitalier de recherche clinique
PL : phospholipide
PNNS : plan national nutrition santé
qPCR : quantitative polymerase chain reaction
QR : quotient respiratoire
QRNP : quotient respiratoire non protéique
RE : réticulum endoplasmique
REL : réticulum endoplasmique lisse
RER : réticulum endoplasmique rugueux
Rf : retardation factor
RNase H : ribonucléase H
RT : reverse transcriptase
sCD14 : soluble cluster of differentiation 14
SFC : solid fat content
TG : triglycéride
TNF-α : tumor necrosis factor-alpha
TPP : thermogénèse postprandiale
VLDL : very low density lipoprotein

PUBLICATIONS, PARTENARIAT ET PRIX

✓ Publications issues de ces travaux de thèse

Vors C, Capolino P, Guérin C, Meugnier E, Pesenti S, Chauvin MA, Monteil J, Peretti P, Cansell M, Carriere F and Michalski MC. Coupling *in vitro* gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions.

Food and Function, 2012 May;3(5):537-46.

Vors C, Pineau G, Gabert L, Draï J, Louche-Pélissier C, Defoort C, Lairon L, Désage M, Danthine S, Lambert-Porcheron S, Vidal H, Laville L, and Michalski MC. Controlling absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal.

En revision à American Journal of Clinical Nutrition, 2012

Gabert L, **Vors C**, Louche-Pélissier C, Sauvinet V, Lambert-Porcheron S, Draï J, Laville L, Désage D and Michalski MC. ¹³C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1-¹³C₃] tripalmitin and [1,1,1-¹³C₃] triolein.

Rapid Communication in Mass Spectrometry, 2011 Oct 15;25(19):2697-703

✓ Autre publication

Laugerette F, **Vors C**, Géloën A, Chauvin MA, Soulage C, Peretti N, Lambert-Porcheron S, Alligier M, Burcelin R, Laville M, Vidal H, Michalski MC. 2010. Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation.

Journal of Nutritional Biochemistry, 2011 Jan;22(1):53-9 (en annexe).

✓ Revue bibliographique

Laugerette F,* **Vors C**,* Peretti N, Michalski MC. 2010. Complex links between dietary lipids, metabolic endotoxemia and inflammation.

Biochimie, 2011 Jan;93(1):39-45 (en annexe).

*Co-premier auteur.

✓ Travaux présentés sous format poster ou de communication orale

Poster présenté lors de la **Journée Scientifique de l'Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (IMBL)**, à Marseille, en novembre 2009 :

"Lipid digestion increases endotoxemia in humans and in vitro"

Laugerette F, **Vors C**, Chauvin MA, Peretti N, Burcelin R, Laville M, Vidal H and Michalski MC.

Poster présenté lors du congrès francophone de la **SFD (Société Francophone du Diabète)**, à Genève, en mars 2011 :

“Cinétiques postprandiales d’absorption et d’oxydation des lipides selon l’état émulsionné de la matière grasse ingérée chez le volontaire de poids normal ou obèse”

Vors C, Gabert L, Desage M, Lambert-Porcheron S, Normand S, Laville M, Vidal H, Michalski MC.

Poster présenté lors du congrès européen **FENS (Federation of European Nutrition Societies)**, à Madrid, en octobre 2011 :

“Influence of fat emulsification on postprandial lipemia and lipid oxidation in lean and obese subjects”

Vors C, Drai J, Gabert L, Pineau G, Lambert-Porcheron S, Désage M, Laville M, Vidal H and Michalski MC

Poster présenté lors du congrès européen **ECO (European Congress of Obesity)**, à Lyon, en mai 2012 :

“Emulsified fat enhances postprandial lipemia and exogenous lipid oxidation compared with bulk fat in normal weight and obese humans”

Communication orale réalisée au congrès national de l’**AFERO (Association Française d’Etudes et de Recherches sur l’Obésité)**, à Nice, en janvier 2011 :

“Influence de l’état émulsionné de la matière grasse sur la cinétique d’oxydation des lipides chez l’homme de poids normal ou obèse”

Vors C, Gabert L, Desage M, Lambert-Porcheron S, Normand S, Laville M, Vidal H, Michalski MC.

Communication orale réalisée au congrès européen de l’**EFL (Euro Fed Lipid)**, à Rotterdam, en septembre 2011 :

“Influence of fat emulsified state on the kinetics of postprandial lipemia and exogenous lipid oxidation in healthy normal weight and obese subjects”

Vors C, Drai J, Gabert L, Pineau G, Lambert-Porcheron S, Désage M, Laville M, Vidal H, and Michalski MC

✓ Partenariat

- Mes travaux de thèse sur le protocole Lipinflox ont été réalisés dans le cadre d'un partenariat avec l'interprofession laitière (CNIEL). J'ai bénéficié, dans ce cadre, d'une allocation doctorale co-financée par le département d'Alimentation Humaine de l'INRA (AlimH) et le CNIEL.

- Mes travaux *in vitro* ont été effectués dans le cadre d'un projet collaboratif au sein de l'Institut Carnot LISA avec le laboratoire Transferts Ecoulements Fluides Energétiques (TREFLE, UMR 8508, Bordeaux) et le laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse (EIPL, UMR 7282, Marseille).

✓ Prix

Obtention d'une bourse scientifique de la Fondation Nestlé France 2011 d'un montant de 20 000 euros.

INTRODUCTION

Le développement quasi-parallèle des maladies métaboliques et du changement des habitudes alimentaires a révélé qu'en plus d'une composante génomique propre à chaque organisme, des facteurs environnementaux, et notamment nutritionnels, sont impliqués dans les mécanismes de ces maladies. On constate alors ces dernières années que la montée en puissance de l'obésité, véritable épidémie mondiale, est étroitement liée à une alimentation déséquilibrée hypercalorique associée à une augmentation de la sédentarité. Il est désormais clairement établi que l'obésité constitue à elle seule un facteur de risque indépendant d'insulino-résistance, de diabète, de dyslipidémie et de pathologies cardiovasculaires. Cette maladie des temps modernes est donc un véritable fléau pour nos sociétés actuelles, tant sur le plan économique que psychologique et social. Il est urgent d'intervenir et les plans nationaux de prévention, qui place la nutrition au cœur des priorités, sont plus que jamais d'actualité (Plan National Nutrition Santé et Plan Obésité en France).

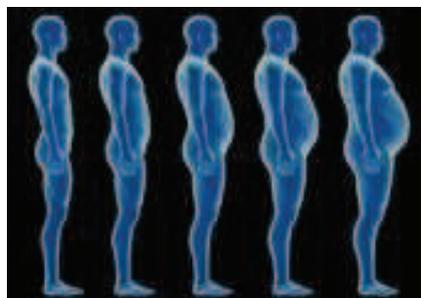
L'obésité représente la conséquence d'un déséquilibre chronique de la balance énergétique et plus spécifiquement de la balance de répartition des graisses, entre beta-oxydation et stockage. De nombreuses anomalies métaboliques peuvent néanmoins survenir, avant même que le stade d'obésité critique soit atteint. Parmi les facteurs de risque d'insulino-résistance et cardiovasculaires, on retrouve une lipémie élevée et prolongée au cours de la digestion ainsi qu'une inflammation de faible intensité qui s'installe de manière chronique. La revue de la littérature actuelle met alors en avant l'implication de nouveaux acteurs dans ces phénomènes à risque, à savoir les endotoxines bactériennes. En effet, les endotoxines issues des bactéries Gram négatif du microbiote intestinal peuvent être co-absorbées avec les acides gras alimentaires puis incorporées aux chylomicrons et véhiculées ainsi vers les tissus cibles en phase postprandiale. Ayant la capacité d'activer les cellules immunitaires et d'induire alors la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ces endotoxines participeraient à l'établissement et au maintien d'un état inflammatoire chronique.

Un intérêt tout particulier doit donc être porté à la modulation de la lipémie et de l'inflammation métabolique. Des traitements pharmacologiques (hypolipémiants, anti-inflammatoires) ont déjà été mis en place pour traiter les désordres métaboliques chroniques et des stratégies de prévention nutritionnelle ont également vu le jour. En effet, de nombreux

travaux, dont ceux de notre équipe, démontrent que la qualité, la quantité et plus récemment la structuration des lipides dans les aliments peuvent affecter leur absorption intestinale et seraient donc à même de modifier d'autres effets métaboliques associés. En revanche, l'impact de tels facteurs sur le devenir métabolique des lipides, et notamment leur orientation vers la beta-oxydation ou le stockage est encore méconnu et le lien avec l'endotoxémie pro-inflammatoire reste à étudier chez l'Homme.

CHAPITRE 1 – CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

1. OBESITE, CHRONIQUE D'UNE PANDEMIE ANNONCEE



1.1. Epidémiologie de l'obésité

1.1.1. Définition

L'obésité est devenue un problème de santé publique majeur, à la fois dans les pays développés et en voie de développement. Elle a été reconnue comme une maladie en 1997 par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et définie comme une « accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé ». On distingue deux types d'obésité, selon la répartition de la masse grasse : l'obésité androïde (dite aussi abdominale ou viscérale), caractérisée par une répartition de la masse grasse dans la partie haute du corps, surtout au niveau du ventre, et l'obésité gynoïde, où l'excès de masse grasse se concentre plus bas, au niveau des cuisses notamment. L'obésité androïde expose davantage les personnes aux complications métaboliques (Vague 1956).

L'indicateur le plus communément utilisé est l'indice de masse corporelle (IMC), un indice simple qui permet d'estimer le degré de surpoids et d'obésité chez des individus adultes. Il correspond au poids en kilogrammes divisé par le carré de la taille exprimée en mètres (kg/m^2). L'IMC s'applique aux adultes des deux sexes et à toutes les tranches d'âge. Le statut d'obésité est alors défini pour un IMC supérieur ou égal à $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ (**tableau 1**). Il doit toutefois être considéré comme une indication approximative car il ne correspond pas nécessairement au même pourcentage de masse grasse selon les individus.

Tableau 1. Seuils de corpulence en fonction de l'IMC d'après l'OMS

IMC (kg/m^2)	Statut
$< 18,5$	maigre
$18,5 \leq \text{IMC} < 25$	normal
$25 \leq \text{IMC} < 30$	surpoids
$30 \leq \text{IMC} < 35$	obésité modérée - Classe I
$35 \leq \text{IMC} < 40$	obésité sévère - Classe II
$\text{IMC} \geq 40$	obésité massive/morbide - Classe III

Ces seuils ne sont pas directement utilisables dans le cas des enfants et des adolescents car, lors de leur croissance, leur organisme subit un certain nombre de changements physiologiques. Des courbes de référence ont été établies sur des données recueillies dans différents pays en fonction du sexe et de l'âge ; l'IMC calculé est alors comparé aux courbes

référence de centiles figurant dans le carnet de santé. En Europe, l'ECOG (European Children Obesity Group) a défini l'obésité chez l'enfant pour des valeurs d'IMC \geq 97^{ème} percentile.

Chez l'adulte, d'autres méthodes d'évaluation de la composition corporelle, en particulier de la masse grasse, sont utilisées en complément du calcul de l'IMC. La mesure du tour de taille (circonférence de l'abdomen) est un exemple de mesure directe permettant d'identifier un excès de masse grasse viscérale. Lorsque le tour de taille est supérieur à 88 cm chez la femme ou 102 cm chez l'homme, il s'agit alors d'une obésité abdominale. Le tour de hanches est également mesurable afin de calculer le rapport tour de taille / tour de hanches : celui-ci doit être inférieur à 0,85 chez les femmes et inférieur à 1 chez les hommes. Cet indice reste, néanmoins, davantage utilisé pour évaluer le risque d'accident cardiovasculaire du sujet. Par ailleurs, l'impédancemétrie ou encore l'absorption bi-photonique à rayons X (DEXA en anglais) peuvent être utilisées afin d'obtenir les pourcentages respectifs de masse grasse et de masse maigre ; cependant, ces méthodes sont bien plus coûteuses et difficiles à mettre en place en routine, en comparaison des calculs de l'IMC et du rapport taille/hanches.

En pratique, le calcul de l'IMC reste la méthode la plus utilisée et sert préférentiellement de référence pour l'estimation de la prévalence de l'obésité au sein des populations.

1.1.2. Prévalence dans le monde et en France

L'obésité suit une progression galopante dans le monde entier depuis ces 30 dernières années. En effet, d'après une étude très récente publiée dans la revue britannique *The Lancet* (Finucane *et al.* 2011), la prévalence de l'obésité a quasiment doublé dans le monde depuis 1980 et touche désormais 205 millions d'hommes et 297 millions de femmes, soit 9,8 % des hommes et 13,8 % des femmes. Il est également ressorti de cette étude que l'augmentation de l'IMC touche aussi bien les pays industrialisés, dits « pays riches », que les pays en voie de développement, à revenus bas ou moyen.

Ces estimations alarmantes laissent présager une situation de plus en plus inquiétante si aucune action directe n'est mise en place. En 2005, l'OMS estimait déjà que près de 700 millions de personnes seraient obèses et 2,3 milliards en surpoids d'ici à 2015. Corrélativement, une étude américaine parue en 2007 prévoyait que 41% des américains seraient obèses et 75% en surpoids d'ici 2015 (Wang *et al.* 2007).

En France, selon la dernière enquête ObEpi-Roche (2009), 31,9 % des plus de 18 ans (soit 14 millions de personnes) sont en surpoids et 14,5 % (soit 6,5 millions) sont obèses, cette proportion ayant doublé entre 1997 et 2009.

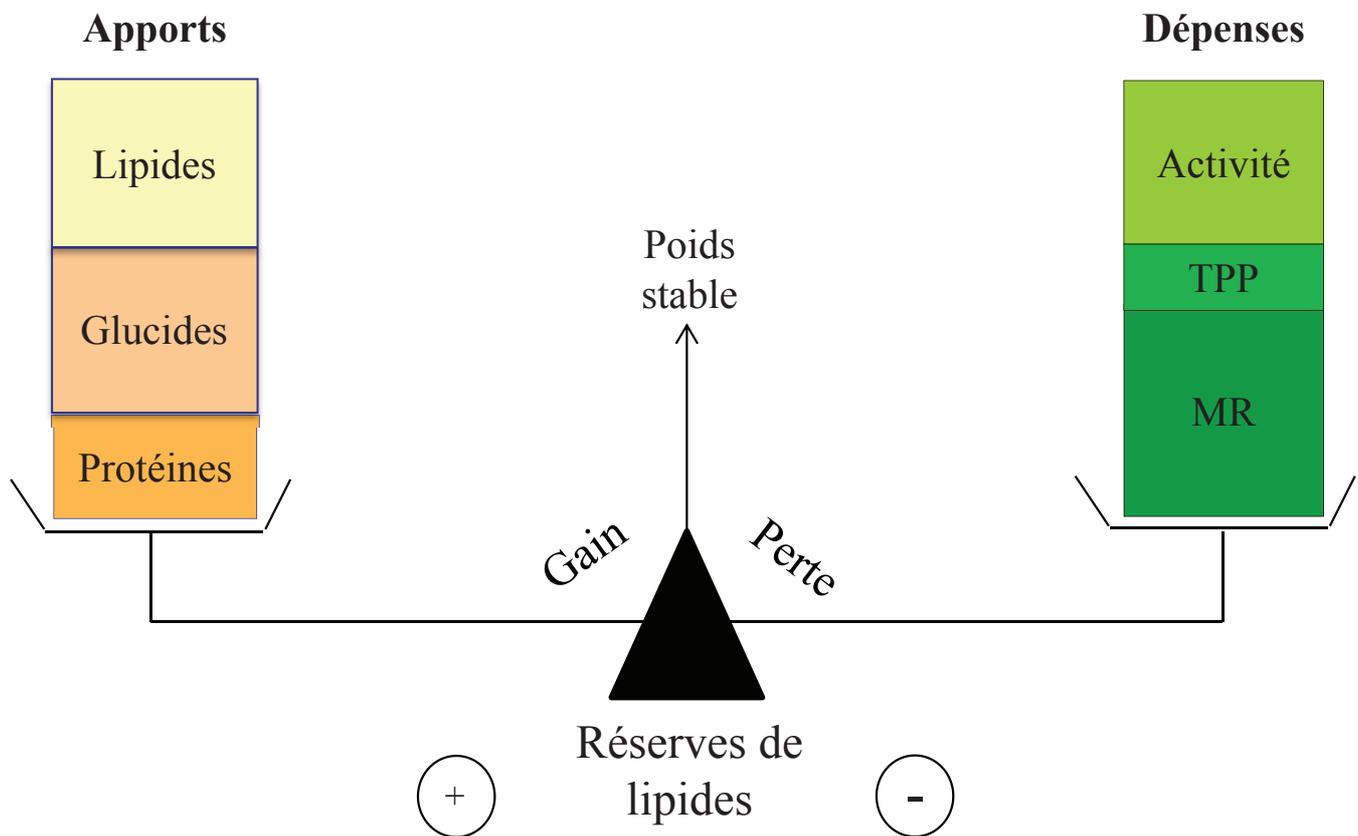


Figure 1. Balance des apports et des dépenses énergétiques

TPP : thermogénèse postprandiale ; MR : métabolisme de repos

L'obésité infantile connaît également une augmentation à un rythme alarmant : selon l'International Obesity Task Force (IOTF), plus de 200 millions d'enfants et d'adolescents dans le monde sont en surcharge pondérale, dont 40 à 50 millions obèses.

1.2. Etiologie de la maladie et comorbidités

1.2.1. Déséquilibre de la balance énergétique

Notre organisme répond au principe de conservation de l'énergie. La balance énergétique repose ainsi sur la différence entre les « entrées » (énergie calorique ingérée) et les « sorties » (dépense énergétique totale). L'équilibre de cette balance permet d'avoir un poids stable tandis qu'une augmentation et/ou une réduction de la dépense énergétique entraînent un gain de masse (**figure 1**). Un déséquilibre chronique de cette balance énergétique est à l'origine de la maladie de l'obésité ; on parle alors de balance énergétique positive, lorsque les apports sont supérieurs aux dépenses.

Apport énergétique

L'apport énergétique total représente l'énergie ingérée sous forme d'aliments et de boissons pouvant être métabolisés par l'organisme. Elle se calcule grâce à la composition en macronutriments qui présentent des teneurs énergétiques différentes. Les lipides fournissent l'énergie la plus élevée par unité de poids, soit 9 kcal/g, tandis que les glucides et les protéines présentent une valeur énergétique plus faible, soit 4 kcal/g.

D'après les apports nutritionnels conseillés (ANC) publiés par l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, ex-AFSSA), un homme adulte devrait consommer en moyenne 2700 kcal/jour et une femme adulte 2000 kcal/jour afin de couvrir leurs besoins. Les apports énergétiques dépendent ainsi du sexe mais aussi de l'âge et de la dépense énergétique de l'individu. Selon les recommandations actuelles, l'apport énergétique total doit être réparti entre 50-55 % de glucides, 10-15 % de protéines et 35-40 % de lipides (les ANC pour les acides gras ayant été revus en 2010).

Dépense énergétique

La dépense énergétique totale est constituée de 3 composantes principales que sont le métabolisme de repos (MR), la thermogénèse postprandiale (TPP) et l'activité physique

(figure 1). Cette dépense énergétique est ainsi très hétérogène et chaque composante a son propre rôle dans l'étiologie de l'obésité.

✓ Métabolisme de repos

Le métabolisme de repos correspond à l'énergie dépensée au repos, éveillé, à jeun depuis au moins 12 heures, dans une ambiance de neutralité thermique. Dans cette situation, l'exercice physique et l'alimentation n'exercent alors qu'une influence minimale sur le métabolisme. Cette dépense représente ainsi l'énergie nécessaire à une activité métabolique minimale des différents organes afin d'assurer les fonctions vitales. Sur les trois postes de dépense, le métabolisme de repos est le plus important et représente en moyenne les deux tiers de la dépense énergétique totale (soit 65 %, (Rigaud *et al.* 1992)). Il est proportionnel au poids corporel et d'autant plus à la masse maigre qui en est le principal déterminant. Le métabolisme de base d'une personne obèse est ainsi supérieur à celui d'un sujet de poids normal.

✓ Thermogénèse postprandiale

Ce poste correspond à l'énergie dépensée pour digérer, métaboliser et stocker l'énergie contenue dans les aliments. Cette thermogénèse est donc dépendante de la quantité et de la qualité (composition en micronutriments) des aliments consommés. Elle représente en moyenne 10 % de l'énergie ingérée pour un repas mixte standard et n'est observée que quelques heures après le repas. De plus, cette dépense énergétique liée à l'acte alimentaire représente 10 à 15 % de la dépense énergétique totale d'un sujet sédentaire (Rigaud *et al.* 1992).

✓ Activité physique

Ce poste de dépense est le plus variable d'un individu à l'autre. Il correspond à l'énergie nécessaire pour tout mouvement physique en sus du métabolisme de base. Le coût de l'activité physique peut être très variable selon le type d'individu (entraîné ou sédentaire) et suivant l'exercice physique (durée, intensité). On différencie également l'activité physique structurée, c'est-à-dire la pratique régulière d'un sport, de l'activité physique spontanée correspondant aux activités de la vie quotidienne (marche, montée de l'escalier, toilette/habillage...).

Le coût de l'activité physique est souvent exprimé par un index d'activité, le NAP (niveau d'activité physique), correspondant au rapport de la dépense énergétique totale et du

métabolisme de repos. Le NAP permet de classer les individus, un NAP élevé caractérisant un individu actif (Black *et al.* 1996).

La dépense énergétique associée à l'activité physique augmente avec le poids ; ceci n'est valable, cependant, que jusqu'à un certain degré d'obésité où l'activité physique devient difficile et limitée, la dépense énergétique correspondante étant alors peu importante. Le NAP s'effondre pour des valeurs de poids élevées.

Le déséquilibre de la balance énergétique serait favorisé par des facteurs d'ordre génétique et environnemental entraînant une prise de poids et donc, sur le long terme, une obésité, définie ainsi comme une maladie complexe et multifactorielle.

1.2.2. Facteurs obésogènes

Les facteurs génétiques peuvent être impliqués dans l'étiologie de l'obésité mais, dans la plupart des cas, les gènes en cause seraient des gènes interagissant avec les facteurs de l'environnement liés à la consommation et à la dépense d'énergie. Cette maladie serait donc avant tout la résultante de prédispositions génétiques associées à un environnement défavorable (Dubern *et al.* 2007). Ainsi, la cause génétique unique est rare et ne peut à elle seule expliquer la croissance galopante de l'obésité ; l'implication de facteurs environnementaux dans les mécanismes de l'obésité est désormais indiscutable.

Ces dernières années, la montée en puissance de l'obésité est étroitement liée à une alimentation hypercalorique associée à une augmentation de la sédentarité. En effet, l'accès à une nourriture riche en énergie est de plus en plus facile et les nombreuses innovations technologiques ont facilité les déplacements mais limité les dépenses énergétiques. Par ailleurs, des équipes de recherche s'intéressent désormais à de « nouveaux » déterminants de l'obésité. En 2009, le National Institute of Health a ainsi lancé un appel à projets sur les causes non traditionnelles de l'obésité. De nouveaux facteurs sont désormais bien décrits comme ayant un rôle à part entière dans son développement (McAllister *et al.* 2009) ; sont alors évoqués, entre autres, les polluants/perturbateurs endocriniens, le stress, les médicaments et le microbiote intestinal. Une attention particulière sera portée à ce dernier facteur dans le manuscrit ; les liens entre obésité et microbiote intestinal seront plus amplement détaillés en 5.2.1.

1.2.3. Complications métaboliques associées

L'obésité peut favoriser l'apparition de maladies concomitantes, appelées comorbidités. Celles-ci peuvent toucher presque tous les organes du corps humain et apparaissent ou s'aggravent d'autant plus que l'IMC est élevé. Le pronostic vital peut alors être engagé : d'après l'OMS, chaque année, plus d'1 million de décès sont attribués aux maladies liées à l'obésité et, selon une étude parue dans *New England Journal of Medicine* en 2006, réalisée sur une très large cohorte de plus de 500 000 américains, le risque de mortalité est 2 à 3 fois plus élevé pour les personnes obèses à partir de 50 ans (Adams *et al.* 2006).

Parmi les deux principales complications d'ordre métabolique, on note tout d'abord le diabète de type 2, l'une des maladies métaboliques les plus répandues au 21^{ème} siècle. Le diabète de type 2 se caractérise par une hypertriglycémie chronique, à jeun comme en postprandial. Le premier stade de cette maladie est une insulino-résistance, soit une diminution de la réponse cellulaire et tissulaire à l'insuline, provoquant une hausse de la glycémie mais aussi, en réponse, une sécrétion accrue d'insuline. Le pancréas devient par la suite incapable de produire suffisamment d'insuline pour lutter contre cette résistance et les cellules bêta pancréatiques finissent à long terme par être détruites, interrompant toute production d'insuline et causant ainsi le diabète. Les mécanismes exacts conduisant de l'obésité au diabète sont toujours largement étudiés mais l'un des liens importants entre obésité et diabète reste la résistance à l'insuline (Kahn *et al.* 2000), très fréquente chez les personnes obèses. Des facteurs comme la lipotoxicité entrent alors en ligne de compte. En effet, il a été clairement démontré que lorsque des îlots de Langerhans sont exposés de manière chronique à des concentrations élevées d'acides gras (comme chez les obèses), des triglycérides s'accumulent dans les cellules bêta pancréatiques et produisent une inhibition de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose ainsi qu'une lipotoxicité conduisant à la destruction des cellules par apoptose, participant alors à l'installation d'un diabète (Unger 1995) (Poitout *et al.* 2008). En complément, des données épidémiologiques confirment que le risque de diabète de type 2 augmente de manière continue avec l'IMC et l'adiposité abdominale (Wang *et al.* 2005). Enfin, il est important de noter que même si 90 % des personnes diabétiques sont obèses ou en surcharge pondérale, un certain nombre d'obèses ne sont pas diabétiques, et ne présentent même aucune des anomalies métaboliques observées chez les diabétiques. Ces obèses dits « métaboliquement sains » font actuellement l'objet de nombreuses recherches (Blüher 2010).

Les dyslipidémies constituent la seconde complication métabolique majeure connue de l'obésité (Franssen *et al.* 2011). Elles consistent en des anomalies lipidiques plasmatiques,

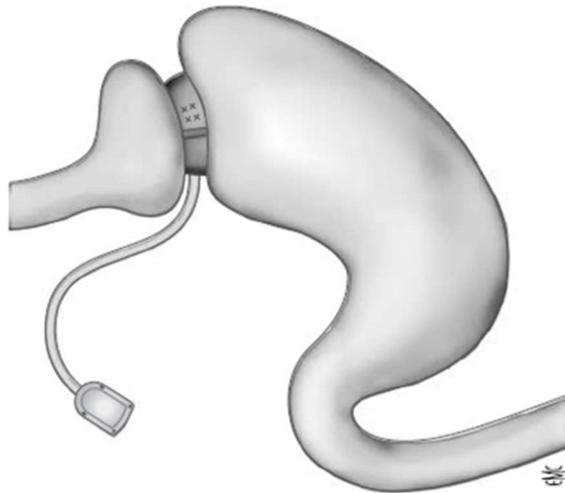
avec des concentrations élevées en triglycérides et/ ou en LDL-cholestérol et des taux faibles en HDL-cholestérol. Chez l'obèse, l'insulino-résistance induit une concentration plus élevée en AGNE circulants en levant l'inhibition de la lipolyse adipocytaire. En parallèle, l'absence de sensibilité à l'insuline induit une augmentation de la sécrétion hépatique de VLDL, participant ainsi à une hypertriglycémie. En outre, l'obésité, en particulier l'obésité abdominale, favorise une hypercholestérolémie, en modifiant les proportions respectives des transporteurs HDL et LDL : la concentration plasmatique élevée en VLDL engendre un excès d'échanges de TG depuis les VLDL vers les LDL et HDL, devenant à leur tour enrichies en TG et subissant l'hydrolyse de la lipase hépatique, ce qui conduit (i) à une diminution des HDL natives au profit de plus petites particules HDL (sous-classes pro-athérogènes) et (ii) à une augmentation de petites et denses particules LDL (aussi pro-athérogènes).

De manière plus générale, on parle alors de syndrome métabolique, regroupant les signes cliniques de l'obésité et de ses complications multiples : adiposité viscérale, dyslipidémie, hyperglycémie et hypertension (Alberti *et al.* 2005).

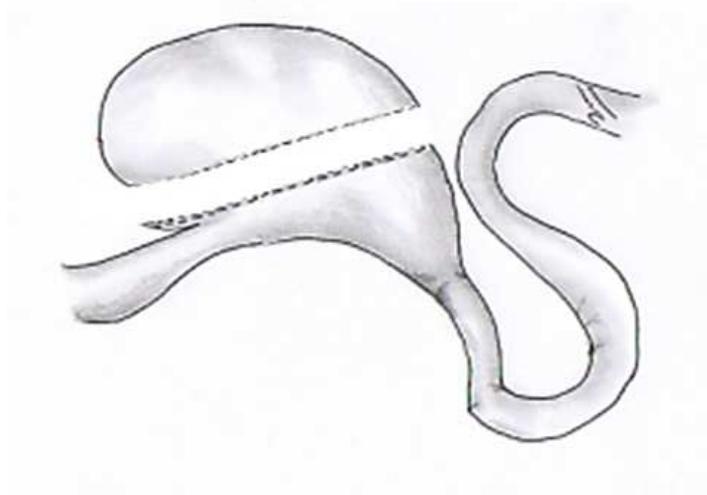
1.3. Traitement de l'obésité

Le traitement de l'obésité passe avant tout par une perte de poids, en essayant que celle-ci soit stable dans le temps. Ce traitement comprend plusieurs méthodes, différentes selon le degré d'obésité. A l'heure actuelle, trois options thérapeutiques sont proposées aux personnes obèses : le changement de leur mode de vie *via* une alimentation et une activité physique adaptées, la pharmacothérapie *via* l'inhibition de l'absorption des graisses et la chirurgie bariatrique en derniers recours.

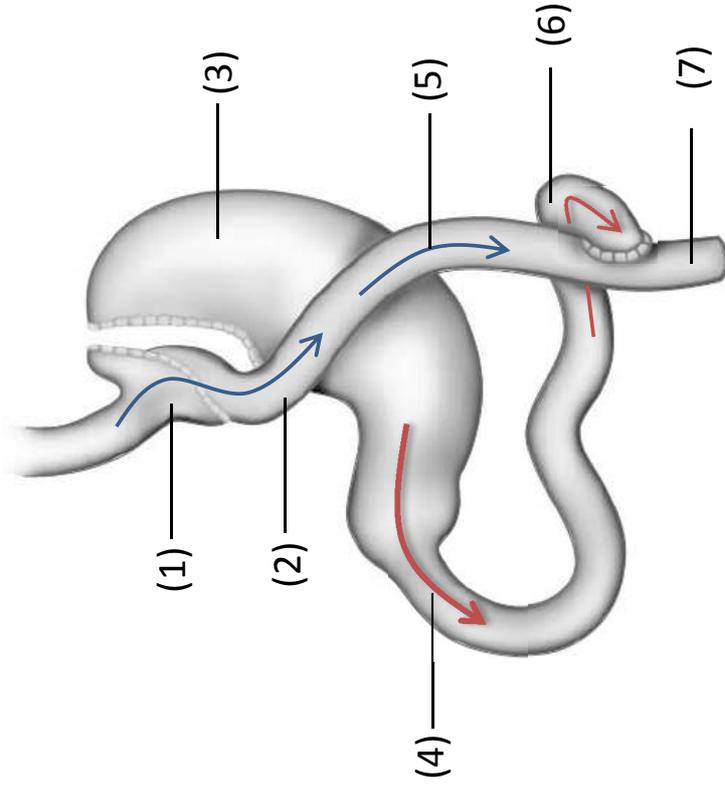
L'efficacité de la première méthode, basée sur une modification de l'hygiène de vie, est malheureusement assez limitée, notamment pour des personnes obèses (Miller 1999). Dans le cadre de la seconde, l'action des médicaments utilisés dans le traitement de l'obésité vise essentiellement la prise alimentaire ou l'absorption des nutriments, en particulier celle des lipides. Plusieurs médicaments ont donc été développés afin d'influencer la prise alimentaire, *via* le système nerveux central. Ce sont les anorexigènes, capables d'augmenter la sensation de satiété. Un certain nombre ont fait leur preuve dans le passé mais nombreux ont été stoppés à cause de la dépendance ou des effets secondaires (risques d'hypertension et cardiovasculaires). On retiendra ainsi que la prise de ces médicaments anti-obésité s'est très



Anneau de gastroplastie ajustable



Sleeve gastrectomie



By-pass gastrique*

Figure 2. Principales techniques de chirurgie bariatrique

* Légende : (1) poche gastrique proximale, (2) anse alimentaire, (3) estomac exclu, (4) circuit des sécrétions biliaires et pancréatiques, (5) circuit des aliments, (6) anse biliaire, (7) anse commune.

souvent conclue par un échec en raison de leur rapport bénéfices/risques insuffisant dans le traitement de la maladie.

Compte tenu de l'inefficacité de ces traitements, une méthode alternative plus invasive a vu le jour dans les années 1980, celle de la chirurgie bariatrique. Cette dernière, aussi appelée chirurgie de l'obésité, consiste à restreindre l'absorption des nutriments, soit en réduisant uniquement la capacité gastrique, soit en dérivant une partie du tube digestif en plus d'une réduction du volume de l'estomac (chirurgie mixte). L'intervention chirurgicale est la solution la plus radicale et s'adresse avant tout aux personnes présentant une obésité morbide ($\text{IMC} \geq 40 \text{ kg/m}^2$). Un bon nombre de techniques chirurgicales ont vu le jour depuis les années 1960 mais beaucoup ont été abandonnées en raison des complications sévères engendrées ; seules les techniques encore couramment utilisées à l'heure actuelle seront détaillées ici (**figure 2**).

Les chirurgies de réduction gastrique pure correspondent généralement à une gastroplastie (pose d'un anneau ajustable) ou à une *sleeve* gastrectomie (résection gastrique de plus des 2/3 de l'estomac). L'anneau de gastroplastie ajustable réduit le volume de l'estomac à 15-20 mL et les patients peuvent espérer une perte de poids en moyenne de 40 à 50% en 5 ans. Elle est toujours pratiquée en raison de son caractère réversible et de son faible risque opératoire. La *sleeve* gastrectomie, ou gastrectomie en manchon, consiste à enlever une grande partie du fundus sans interrompre la continuité normale gastro-intestinale ; le volume de l'estomac restant varie de 250 à 300 mL. Cette technique connaît un franc succès dû à la faible incidence des complications, à la faible mortalité post-opératoire (0,2 %) (Shi *et al.* 2010) et à la possibilité de conversion en d'autres chirurgies en cas de perte de poids non satisfaisante. La perte d'excès de poids est reportée en moyenne à 60-70% en 3 ans (Fischer *et al.* 2012).

Parallèlement, le by-pass gastrique est largement pratiqué et correspond à une technique chirurgicale mixte, impliquant une réduction gastrique et une diminution de l'absorption due à une dérivation de l'intestin grêle. Il est indiqué, en première intention, à des personnes dont l'IMC est $> 50 \text{ kg/m}^2$ présentant un diabète de type 2 et âgées de plus de 40 ans ; il est aussi très souvent proposé comme réintervention après un échec d'une technique restrictive. Le by-pass gastrique consiste en la réalisation d'une nouvelle petite poche gastrique proximale (20-30 mL) par agrafage de la partie supérieure de l'estomac, puis en la jonction de cette poche gastrique à l'intestin grêle par l'intermédiaire d'une anastomose gastrojéjunale sur une anse « en Y ». Concrètement, l'anse alimentaire est anastomosée à la poche gastrique proximale et conduit les aliments ingérés vers l'anse commune, qui correspond au segment d'intestin où l'anse alimentaire rejoint l'anse biliopancréatique. Cette dernière a, en fait, été exclue du

circuit alimentaire et fait suite à l'estomac résiduel ; elle transporte uniquement les sécrétions biliaires, gastriques et pancréatiques. L'absorption des nutriments, notamment des lipides, a ainsi lieu au niveau de l'anse commune où les nutriments rencontrent les sécrétions biliopancréatiques. On comprend alors que cette absorption est fortement compromise compte tenu de la réduction de la surface d'absorption associée au retard du contact entre les enzymes digestives et le bol alimentaire. La perte moyenne d'excès de poids, dépendant de la longueur de l'anse « en Y », est estimée dans la littérature à 75-80 % (Fobi 2004). Cette perte de poids s'avère plus rapide et plus importante que celle observée lors de procédures restrictives, notamment lors de la 1^{ère} année post-opératoire (Fischer *et al.* 2012). Les patients doivent absolument bénéficier d'une prise en charge nutritionnelle durant les années suivant leur opération, notamment pour pallier les différentes carences auxquelles ils sont exposés. La perte de poids et les traitements médicamenteux concomitants permettent une nette amélioration des comorbidités telles que le diabète, les dyslipidémies etc. (Schauer *et al.* 2012) (Benaïges *et al.* 2012). Enfin, contrairement à de nombreuses idées reçues, le by-pass gastrique n'est pas une technique irréversible : plusieurs articles ont rapporté des conversions en anatomie normale par sections des anses alimentaire et biliaire associées à de nouvelles anastomoses (Chevallier 2010), en raison notamment de la survenue de conséquences métaboliques graves.

CHAPITRE 1 – CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

2. LES LIPIDES ALIMENTAIRES

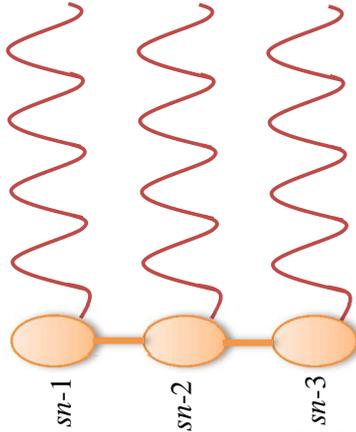


Acides gras libres

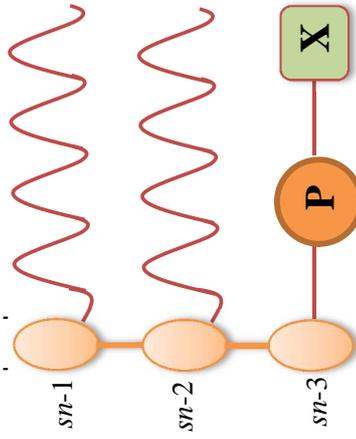


Triglycérides

Base de glycérol



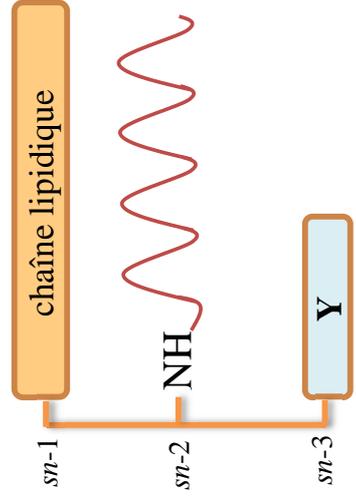
Phospholipides



P : groupement Phosphate
X : choline, éthanolamine, sérine, inositol.

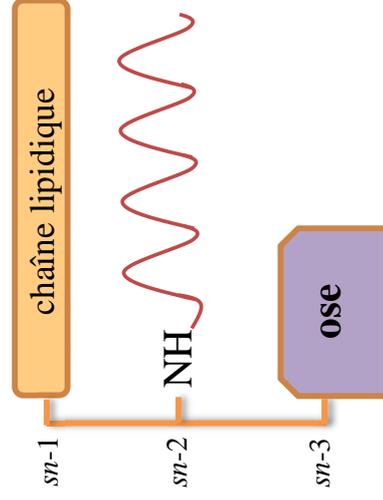
Sphingolipides

Base de sphingosine



Y : divers groupements possibles (hydrogène, oses, phosphorylcholine...)

Glycolipides



Lipides neutres

Lipides polaires

Figure 3. Principales sources d'acides gras alimentaires et leurs structures moléculaires

2.1. Définition et classification

Les lipides constituent une famille hétérogène de molécules organiques insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires. La grande majorité des lipides alimentaires sont composés de molécules d'acides gras estérifiés sous la forme de triglycérides (TG) (**figure 3**). En effet, les triglycérides représentent 95 à 98 % des lipides alimentaires ingérés, constituant ainsi la source presque exclusive d'acides gras alimentaires. Les phospholipides (PL) constituent la seconde classe de lipides alimentaires, à hauteur de 3 à 5%. L'alimentation peut également apporter des acides gras libres, des sphingolipides et des glycolipides (quelques pour-cent selon les sources alimentaires) (**figure 3**). Les stérols alimentaires (cholestérol et phytostérols), sont d'autres constituants lipidiques classés à part, et non traités dans ce manuscrit.

Les acides gras, qui représentent le motif structural des lipides (**figure 3**), sont des acides carboxyliques comportant une chaîne hydrocarbonée avec un groupement carboxyle (COOH) et un groupement méthyle (CH₃). Les acides gras alimentaires sont très généralement des molécules linéaires à nombre pair de carbones ; on peut néanmoins trouver des acides gras à nombre impair de carbones (acides pentadécyclique C15:0 et margarique C17:0) ou des acides gras à chaîne ramifiée (Ran-Ressler *et al.* 2011), dans la matière grasse laitière par exemple.

La nomenclature biochimique des acides gras est fondée sur :

- la longueur de la chaîne carbonée : le nombre de carbones peut varier de 4 à plus de 24 ; les acides gras comportant 4 à 8 carbones sont classés comme acides gras à chaîne courte, de 10 à 12 carbones, ils sont dits à chaîne moyenne et à partir de 14 carbones, on parle d'acides gras à chaîne longue ;
- le degré d'insaturation de la chaîne carbonée : on distingue les acides gras saturés (pas de double liaison), monoinsaturés (une double liaison) et polyinsaturés (plusieurs doubles liaisons). Les doubles liaisons peuvent présenter deux types d'isomérisation : elles sont en général en forme *cis* dans notre organisme et les aliments mais des isomères *trans* peuvent aussi être apportés par l'alimentation. A noter que, parmi les polyinsaturés, on distingue les familles d'acides gras oméga 3 (n-3) et oméga 6 (n-6) ; celles-ci ont pour précurseurs respectifs, les acides linoléique et alpha-linolénique, à partir desquels les autres acides gras omégas 3 et 6 sont synthétisés. Le nom de ces familles repose sur le numéro du premier atome de carbone impliqué dans la double liaison en partant du groupement méthyle terminal.

Ces caractéristiques biochimiques entraînent et conditionnent des propriétés physicochimiques et des propriétés de structure très particulières, sur lesquelles nous reviendrons par la suite.

Il faut rappeler que l'origine alimentaire de certains acides gras s'avère primordiale compte tenu de l'incapacité de notre organisme à les synthétiser. Ainsi, sur le plan physiologique, on distingue trois classes d'acides gras :

- les acides gras **indispensables** : ils sont nécessaires au développement et au bon fonctionnement de l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation car ils sont non synthétisables par notre organisme. Il s'agit des acides **linoléique (LA, C18:2)** et **alpha-linolénique (ALA, C18:3)**. L'acide docosahexaénoïque (**DHA, C22:6**) se voit également classé dans cette catégorie étant donné sa faible formation par conversion de l'ALA (Legrand 2010) ;

- les acides gras **conditionnellement indispensables** : ils sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques et peuvent être synthétisés par l'organisme à partir des acides gras précurseurs indispensables. Ils sont, en revanche, rigoureusement requis si leurs précurseurs sont absents. Il s'agit donc de l'ensemble des acides gras dérivés des précurseurs indispensables, soit un grand nombre d'acides gras des familles oméga 3 et oméga 6 ;

- les acides gras **non indispensables** : ce groupe intègre l'ensemble des acides gras que l'organisme est capable de synthétiser pour son fonctionnement ; l'alimentation complète ainsi la synthèse endogène.

Les acides gras indispensables et conditionnellement indispensables constituent le groupe des acides gras essentiels ; les autres sont dits non essentiels (et donc non indispensables).

Au vu des données récentes de la littérature, cette classification basée sur l'indispensabilité des acides gras a prévalu sur la classification biochimique (acides gras saturés, mono-insaturés et polyinsaturés) dans l'établissement des apports nutritionnels conseillés (ANC). Les ANC pour les acides gras, définis en 2001 par l'AFSSA (agence française de sécurité sanitaire des aliments), ont été réactualisés en mars 2010 (Legrand 2010; Astrup *et al.* 2011). On retiendra notamment que l'ANC des lipides totaux doit désormais être compris entre 35 et 40% de l'apport énergétique (AE ; pour un adulte consommant 2000 kcal), contre 30 à 35 % en 2001, et qu'un nouveau sous-groupe d'acides gras saturés (acides laurique, myristique et palmitique) a été distingué et dont l'apport doit être limité à 8% de l'AE.

2.2. Structure des lipides alimentaires

2.2.1. Structure moléculaire

Comme indiqué précédemment, les principales classes des lipides alimentaires sont les triglycérides (TG) et les phospholipides (PL). Leur structure moléculaire est basée sur un ou plusieurs acides gras estérifiés sur une molécule de glycérol, constituant la partie apolaire hydrophobe de la molécule. Les triglycérides ou triacylglycérols sont des triesters d'acides gras et de glycérol tandis que les phospholipides présentent seulement deux chaînes d'acides gras et un groupement phosphate, estérifiés sur le glycérol (**figure 3**).

On distingue trois positions sur le glycérol de ces molécules (TG et PL) : deux positions externes, *sn-1* et *sn-3*, et une position interne, *sn-2* (**figure 3**). Dans les matières grasses naturelles, la répartition des acides gras n'est pas aléatoire, donnant leur spécificité à chaque source alimentaire. Toutefois, de manière générale dans le cas des triglycérides, les acides gras polyinsaturés sont souvent estérifiés en position centrale *sn-2* (Schreiner *et al.* 2004) tandis que les acides gras saturés et mono-insaturés le sont en position *sn-1* (Basdevant *et al.* 2001). Dans le cas des phospholipides, un des deux acides gras est généralement insaturé, le plus souvent en position *sn-2*. Les phospholipides diffèrent également entre eux par la nature du groupement chimique rattaché au groupement phosphate (choline, éthanolamine, sérine, inositol) (**figure 3**).

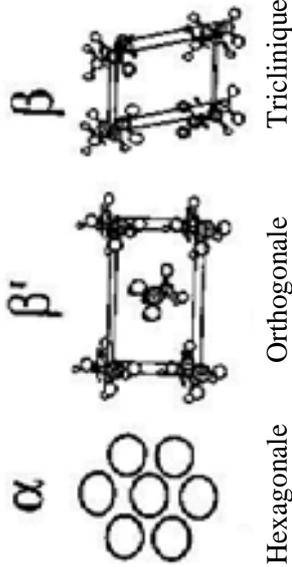
D'autres classes lipidiques minoritaires, vectrices d'acides gras, sont présentes dans les aliments : il s'agit des sphingolipides, dont les acides gras sont fixés sur la sphingosine, et des glycolipides, présentant une chaîne glucidique (ose) en position *sn-3* (**figure 3**). De nombreux aliments tels que certains fruits et légumes, le lait et les produits laitiers ou encore les œufs et le soja contiennent des sphingolipides en quantité non négligeable, variant de quelques microgrammes à 1-2g/kg. Les glycolipides sont, quant à eux, assez abondants dans les végétaux, notamment dans les grains de blé.

Par définition, les phospholipides, sphingolipides et glycolipides forment le groupe des lipides polaires qui s'oppose à celui des lipides neutres (**figure 3**), formés par les triglycérides, diglycérides et monoglycérides. Les lipides polaires jouent un rôle fonctionnel important dans les aliments, en particulier grâce à leur pouvoir émulsifiant et foisonnant. La phosphatidylcholine, plus connue sous le nom de lécithine, est la molécule émulsifiante la plus répandue dans la fabrication de produits alimentaires (mayonnaise, pâtisserie, chocolaterie...).

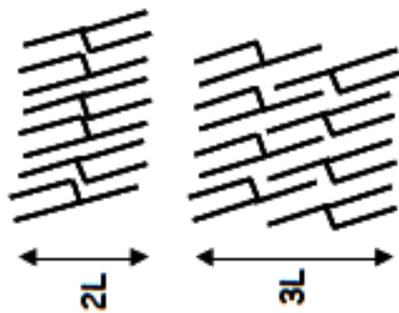
Structures cristallines des triglycérides

Organisation latérale

Variété cristalline :



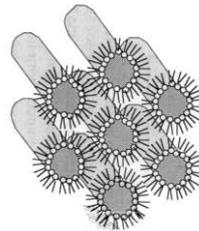
Organisation longitudinale



Structures micellaires et lamellaires des lipides polaires (en présence d'eau)



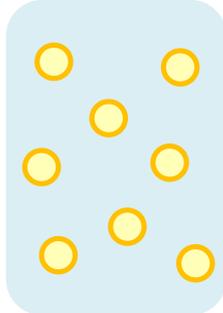
Micelles



Micelles en phase hexagonale



Liposome



Emulsion H/E
(en présence de triglycérides)

Figure 4. Principales structures supramoléculaires de lipides alimentaires

2.2.2. *Structure supramoléculaire*

Les triglycérides d'une part, et les phospholipides/lipides polaires d'autre part, ont la capacité de s'agencer en différentes structures selon leurs propriétés intrinsèques et celles du milieu.

a) *Propriétés thermiques et structures cristallines des triglycérides*

Les caractéristiques biochimiques des triglycérides (longueur et degré d'insaturation des chaînes) leur confèrent un comportement thermique spécifique. En effet, plus la chaîne carbonée est longue et saturée, plus la température de transition de l'état solide à l'état liquide, appelée point de fusion, est élevée. Un mélange liquide de triglycérides amené par refroidissement au-dessous de son point de fusion conduit à une structure solide du fait de la cristallisation de la matière grasse. Sa composition chimique est identique mais elle pourra présenter des différences d'un point de vue cristallin. Le taux de matière grasse encore solide à une température donnée est appelé le Solid Fat Content (SFC). Les molécules vont pouvoir se disposer plus ou moins régulièrement dans l'espace en formant une maille. Les lipides sont ainsi capables de s'organiser en un nombre considérable de structures cristallines ou semi-cristallines selon leur nature chimique, mais aussi en fonction des conditions du milieu (température, pH, hydratation, type de solvant...) : on définit ainsi le polymorphisme lipidique (Karleskind 1992; Ollivon *et al.* 1992).

Dans le cas des triglycérides, les chaînes peuvent s'ordonner selon 2 types d'arrangement lors de la cristallisation : selon une organisation latérale des chaînes hydrocarbonées des molécules lipidiques et selon un empilement en strates de ces molécules.

L'organisation latérale implique différentes sous-cellules cristallines reflétant l'arrangement des motifs de répétition des chaînes; elles sont de 3 types (**figure 4**) :

- hexagonal (désordre statistique des chaînes d'acides gras),
- orthogonal ou orthorhombique (plans perpendiculaires),
- triclinique (plans parallèles).

Trois variétés cristallines, notées α , β' et β , sont associées respectivement aux sous-cellules de type hexagonal, orthogonal et triclinique. Ces différentes structures cristallines peuvent être observées pour un seul et même triglycéride, en fonction des conditions de cristallisation. En effet, les variétés cristallines se forment selon la vitesse de refroidissement : si celui-ci est lent, on obtient alors des formes stables β et β' , s'il est rapide, la forme α , la moins stable, est obtenue. La stabilité des structures cristallines est directement reliée aux propriétés

thermiques des lipides : plus la forme est stable, plus le point de fusion de la structure sera élevé lors de son réchauffement.

Conjointement, les triglycérides s'organisent selon un empilement longitudinal, sous forme de strates dont l'épaisseur correspond à 2 ou 3 longueurs de chaînes (**figure 4**). Cet empilement dépend donc du nombre de carbones des acides gras mais aussi de leur insaturation.

b) Structures micellaires et lamellaires des lipides polaires en milieu aqueux

D'autres structures supramoléculaires existent dès lors que les lipides se retrouvent en présence d'eau. En effet, les lipides polaires ou encore les acides gras libres, mono- et diglycérides sont par nature amphiphiles, c'est-à-dire qu'ils présentent à la fois une partie hydrophobe (les chaînes d'acides gras) et une partie hydrophile (tête polaire des phospholipides, groupement carboxyl des acides gras libres, mono- et diglycérides). Cette amphiphilie permet à ces types de lipides de s'organiser en différentes structures au contact d'une phase hydrophile (**figure 4**), largement décrites dans la littérature (Luzzati *et al.* 1962). Brièvement, en présence d'un excès d'eau, lorsque la concentration en lipides amphiphiles augmente et passe au-dessus de la concentration micellaire critique (CMC), ceux-ci s'auto-associent sous forme de micelles sphériques (**figure 4**). Dans le cas des lipides monocaténaire (à une seule chaîne, tels que les AGL ou les monoglycérides), si la concentration continue d'augmenter, les micelles s'allongent pour former une phase hexagonale : les lipides y sont organisés en cylindres dont la surface est constituée par les têtes polaires tandis que les chaînes d'acides gras se rassemblent vers l'intérieur pour former un cœur hydrophobe ; les cylindres sont disposés suivant un réseau hexagonal (**figure 4**). Enfin, au-delà d'une certaine concentration, les lipides monocaténaire s'organisent en phases lamellaires, c'est-à-dire en un empilement de bicouches séparées les unes des autres par du milieu aqueux. Dans le cas des lipides bicaténaire, les phases lamellaires sont rapidement obtenues, lorsque la concentration en lipides augmente, après la formation de micelles. Les bicouches sont capables de se refermer sur elles-mêmes, emprisonnant une certaine quantité de phase aqueuse, et donnent ainsi naissance à des structures appelées « liposomes » (**figure 4**). Les phospholipides naturels forment spontanément des liposomes en milieu aqueux. Ils sont classés en fonction de leur taille et du nombre de bicouches qu'ils contiennent (liposomes multilamellaires, unilamellaires de petite taille ou de grande taille, liposomes géants) (Lorin *et al.* 2004). Ce type de structure peut alors être utilisé comme vecteur de plusieurs sortes de composés qu'ils soient hydrosolubles (encapsulés dans la phase aqueuse), liposolubles ou

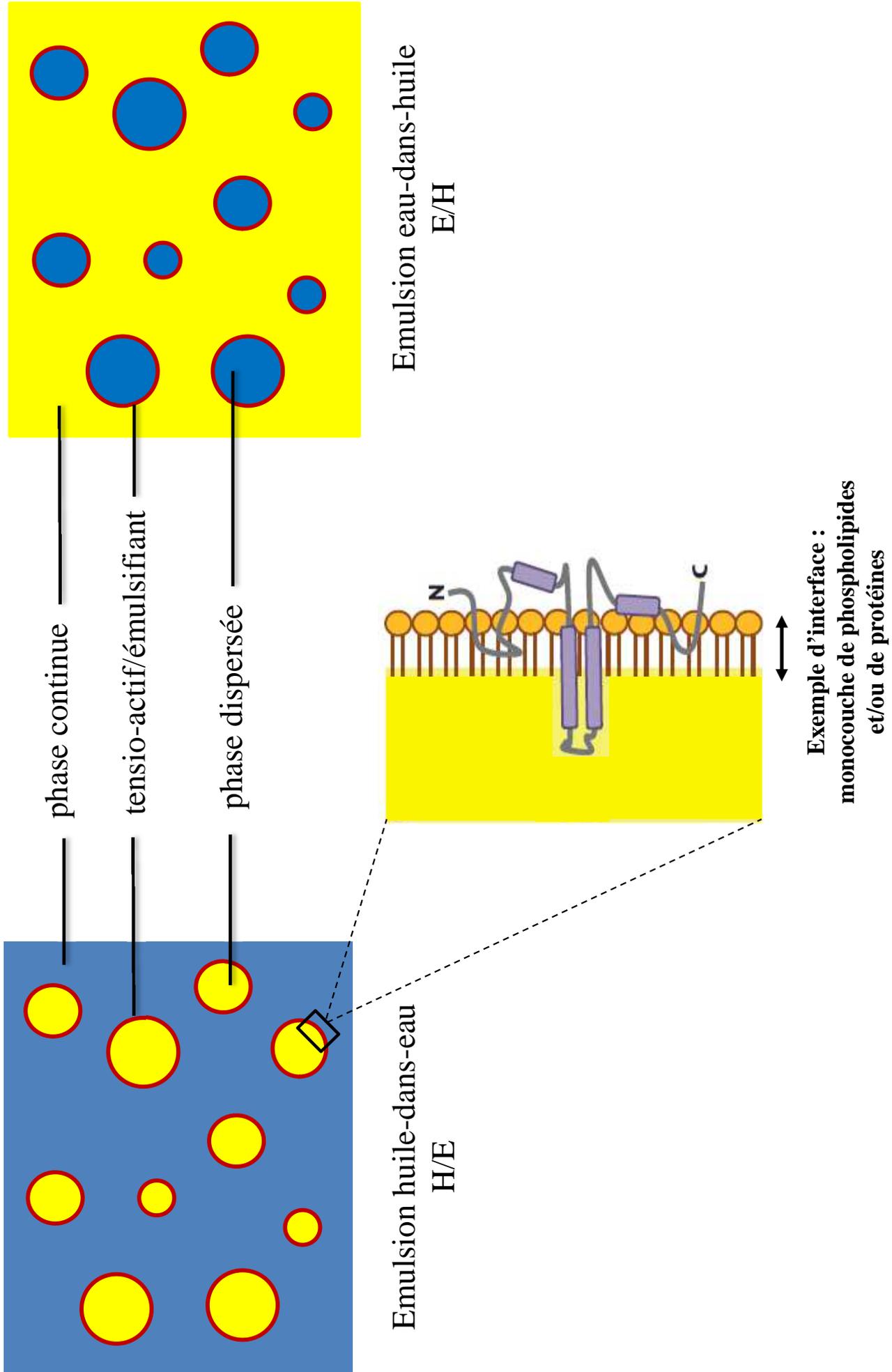


Figure 5. Schéma d'émulsions de type huile-dans-eau (H/E) et eau-dans-huile (E/H)

amphiphiles (empaquetés dans la bicouche lipidique). Les liposomes offrent ainsi de nombreuses applications, notamment en pharmacologie et cosmétologie.

En présence d'une phase triglycéridique, ces lipides polaires peuvent alors s'organiser pour former des gouttelettes lipidiques, en s'adsorbant à l'interface. On parle alors d'émulsion lipidique, dont les applications sont nombreuses (cf. ci-dessous).

2.2.3. *Organisation des lipides dans les aliments*

Les lipides sont rarement consommés en l'état. Ils sont une partie constitutive des aliments. Ils peuvent conserver leur organisation native mais ils se réorganisent généralement en fonction des autres constituants présents et des traitements technologiques appliqués au cours de la formulation ou de la préparation. Ainsi, dans les aliments transformés, à l'échelle macroscopique, on retrouve les lipides :

- soit sous forme libre, en phase continue homogène : c'est le cas des huiles ou du saindoux ;
- soit sous forme d'émulsion : c'est le cas des sauces vinaigrettes et mayonnaises, du lait ou encore des margarines ; les gouttelettes d'émulsion peuvent également être piégées dans un gel (émulsions gélifiées, cas des yaourts) ;
- soit sous forme d'inclusions lipidiques dans des matrices solides (glucidique ou protéique) : c'est le cas des produits élaborés tels que les biscuits et les fromages.

Revenons plus en détail sur la structure émulsionnée car celle-ci est l'une des plus représentées dans l'alimentation ainsi qu'en nutrition clinique. Une émulsion est, par définition, la dispersion de deux liquides non miscibles, sous forme de gouttelettes. Deux phases coexistent : une phase dispersée et une phase continue. Lorsque la phase dispersée est de nature lipidique et la phase continue une phase aqueuse, on parle d'émulsion de type huile-dans-eau (H/E ; beurre et margarines, par exemple) tandis que, lorsque c'est la phase aqueuse qui est dispersée dans la phase lipidique, on parle d'émulsion de type eau-dans-huile (E/H) (**figure 5**). Pour qu'un tel mélange par dispersion soit possible, l'ajout de molécules tensio-actives est indispensable. Ces dernières, appelées « émulsifiants », sont de nature protéique ou lipidique (protéines du lactosérum, caséinates, phospholipides, mono-diglycérides...) et s'adsorbent à l'interface afin de diminuer la tension interfaciale, permettant ainsi de stabiliser l'émulsion (**figure 5**). La taille des gouttelettes de phase dispersée dans les émulsions alimentaires peut varier du dixième de μm à plusieurs centaines de μm . Une émulsion n'est généralement pas constituée de gouttelettes de taille homogène mais présente une plus ou

moins large distribution de tailles, souvent centrée autour d'une valeur moyenne (diamètre moyen). Il faut noter que, d'un point de vue structural, les mousses sont similaires aux émulsions : la phase dispersée est alors un gaz, sous forme de bulles. C'est le cas des crèmes fouettées et mousses au chocolat.

Les émulsions sont des structures de base que l'on peut retrouver dans des aliments naturels. Prenons l'exemple d'une émulsion naturelle consommée très régulièrement : le lait. Sa matière grasse se présente sous la forme de gouttelettes lipidiques (appelées globules gras), dispersées dans une phase aqueuse à base de protéines et de sucre (lait écrémé). Le lait est donc une émulsion naturelle de type H/E. Dans le lait natif (non traité), les globules gras sont stabilisés, à l'interface, grâce à des lipides polaires (mono- et diglycérides, phospholipides, sphingolipides) ; en revanche, dans un lait commercialisé ayant été homogénéisé, l'interface des gouttelettes lipidiques s'est réarrangée et des protéines spécifiques (caséines et protéines du lactosérum) s'ajoutent aux lipides polaires à l'interface (Michalski *et al.* 2006).

Les structures émulsionnées sont très importantes en alimentaire. Compte tenu de l'apport majoritaire des lipides sous la forme de triglycérides, les émulsions représentent un moyen privilégié d'apporter ces lipides, insolubles en phase aqueuse par nature. En outre, de nombreux arômes sont formulés en émulsions car il est très difficile de les traiter dans des systèmes liquides purs. Les caractéristiques de l'émulsion influence aussi considérablement la libération et la perception des composés aromatiques. Les composés odorants hydrophobes sont, en effet, solubilisés préférentiellement dans la phase lipidique liquide (Bongard *et al.* 2006). Par ailleurs, la formulation de nombreux produits alimentaires implique l'introduction de systèmes dispersés afin de mieux en maîtriser la texture ; l'onctuosité et l'homogénéité des mélanges sont très souvent augmentées et prolongées par l'ajout d'émulsifiants de type lécithine (cas des crèmes glacées).

En nutrition clinique, les émulsions sont classiquement utilisées comme moyen de nutrition orale, entérale et parentérale. Un exemple d'émulsion lipidique utilisée en nutrition orale est le Fortimel® du groupe Nutricia, qui sert de supplément énergétique. En nutrition entérale, des solutions nutritives de type émulsion sont administrées par voie digestive via une sonde. En nutrition parentérale, les lipides sont administrés en intraveineuse sous forme d'émulsion à 20 %, à partir d'huile de soja (Intralipide®, Ivelip®) ou d'huile d'olive (Clinoléic®), qui apportent des triglycérides à chaîne longue ; certaines émulsions apportent aussi des triglycérides à chaîne moyenne (Médialipide®).

Enfin, dans le cadre d'un suivi diététique visant une perte de poids, une émulsion lipidique connue sous le nom de Fabules® a été proposée comme régulateur de satiété.

Celle-ci, constituée d'huiles de palme et d'avoine, pourrait jouer sur la satiété en augmentant le temps de transit gastro-intestinal, entraînant alors une diminution de la sensation de faim et donc une réduction de la prise alimentaire (Burns *et al.* 2000; Burns *et al.* 2002; Haenni *et al.* 2009).

CHAPITRE 1 – CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

3. L'INTESTIN : ORGANE COMPLEXE, LIEU D'ABSORPTION DES LIPIDES ET D'INTERACTION AVEC LE MICROBIOTE



3.1. Au cœur d'un système digestif actif

3.1.1. Organisation et physiologie du système digestif

Chez l'Homme, le système digestif comprend de nombreux organes (**figure 6**), chacun jouant un rôle précis dans les différentes étapes de digestion des aliments.

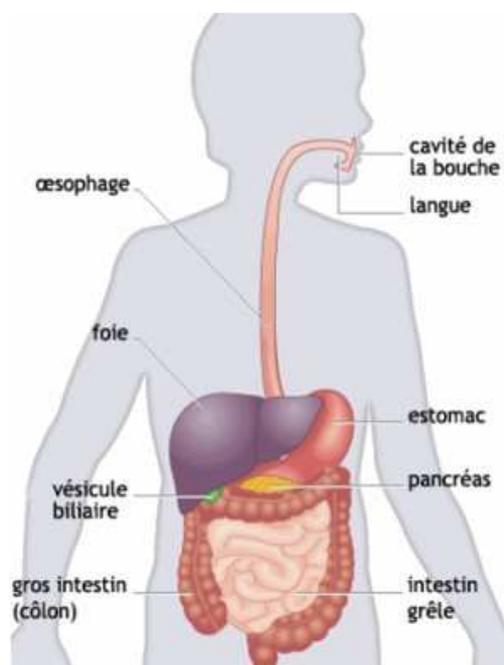


Figure 6. Appareil digestif humain

Le processus digestif débute dans la zone **oro-pharyngée** sous l'action de la mastication et des sécrétions salivaires. L'existence d'une lipase linguale, synthétisée par les glandes salivaires pour participer, dans l'estomac, à l'hydrolyse des triglycérides alimentaires a été longtemps proposée, notamment par le groupe de Margit Hamosh (Hamosh *et al.* 1973; Hamosh 1990), mais aussi beaucoup débattue (Moreau *et al.* 1988). A l'heure actuelle, le sujet est toujours controversé. Selon une revue récente, aucune activité lipolytique significative dans la salive n'aurait été mise en évidence chez l'Homme (N'Goma *et al.* 2012). Cette activité lipolytique serait en tout cas trop faible pour participer activement à une digestion des triglycérides mais pourrait être impliquée dans la perception du goût du gras (Kawai *et al.* 2003; Neyraud *et al.* 2012). La perception oro-sensorielle des lipides alimentaires et notamment sa dimension gustative, ont justement été récemment mises en évidence chez l'Homme, après des années d'étude chez le rongeur (Laugerette *et al.* 2005; Laugerette *et al.* 2007). L'équipe de Richard Mattes montre ainsi que l'Homme est capable de

percevoir de manière spécifique les acides gras à longue chaîne et que cette perception est imputée à la gustation, et non pas à l'olfaction ou à la texture (Chale-Rush *et al.* 2007). La perception orale du gras semble également jouer un rôle essentiel dans la stimulation de la digestion et l'absorption des lipides. En effet, la présence de lipides en bouche suffit à affecter la triglycéridémie postprandiale chez des sujets sains (Mattes 1996; Mattes 2009; Mattes 2009). Une augmentation aussi précoce de la lipémie en réponse au stimulus gras serait due à un déstockage entérocytaire de lipides issus du précédent repas (Mattes 2002).

Les aliments, une fois déglutis, rejoignent l'**estomac** grâce au péristaltisme de l'**œsophage**. Ils sont alors soumis à un mouvement mécanique de brassage important, et ainsi mélangés aux sécrétions gastriques. La muqueuse gastrique sécrète notamment une enzyme clé de la digestion, la lipase gastrique, capable d'hydrolyser les triglycérides alimentaires (cf. Chap.1, § 3.1.2.a) (DeNigris *et al.* 1985). Le brassage mécanique, associé à la génération de molécules tensio-actives (acides gras et diglycérides issus de l'hydrolyse des TG), permet une certaine émulsification du contenu lipidique et ainsi la formation de nombreuses gouttelettes lipidiques. Celles-ci sont alors constituées d'un cœur lipidique hydrophobe, contenant la majorité des TG alimentaires et du cholestérol estérifié, entouré d'une monocouche constituée de phospholipides, de cholestérol libre et de quelques molécules de TG (2-5 mol %, (Pafumi *et al.* 2002). Parallèlement, les protéines sont clivées en polypeptides et les glucides en oligosaccharides, sous l'action d'enzymes spécifiques. L'ensemble de ces produits de digestion constituent le chyme.

Le chyme rejoint ensuite l'intestin grêle, qui se divise en trois parties successives : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Dans le duodénum, le chyme rencontre alors la bile, sécrétée par le **foie**, et les sécrétions du **pancréas**. L'hydrolyse des tri- et diglycérides restants est réalisée, notamment sous l'action de la lipase pancréatique (cf. Chap.1, § 3.1.2.a). Des monosaccharides et acides aminés sont également libérés après digestion des oligo / polysaccharides et polypeptides restants, respectivement. Les acides gras libres et monoglycérides générés sont, quant à eux, micellisés et prêts à être absorbés au niveau du jéjunum (cf. Chap.1, § 3.1.2.b). Celui-ci représente 40% de la longueur totale du grêle ; sa paroi interne est constituée d'une muqueuse tapissée de nombreux replis, permettant une meilleure absorption des nutriments grâce à l'augmentation de la surface totale de contact. Cette muqueuse intestinale est composée de cellules entérocytaires, directement en contact avec le chyle (chyme transformé après action de la bile et du suc pancréatique) ; elle constitue le site préférentiel d'absorption des lipides (Borgstrom *et al.* 1957; Thomson *et al.* 1989). Enfin, l'iléon est le segment terminal où a lieu l'absorption de certains micronutriments, vitamines

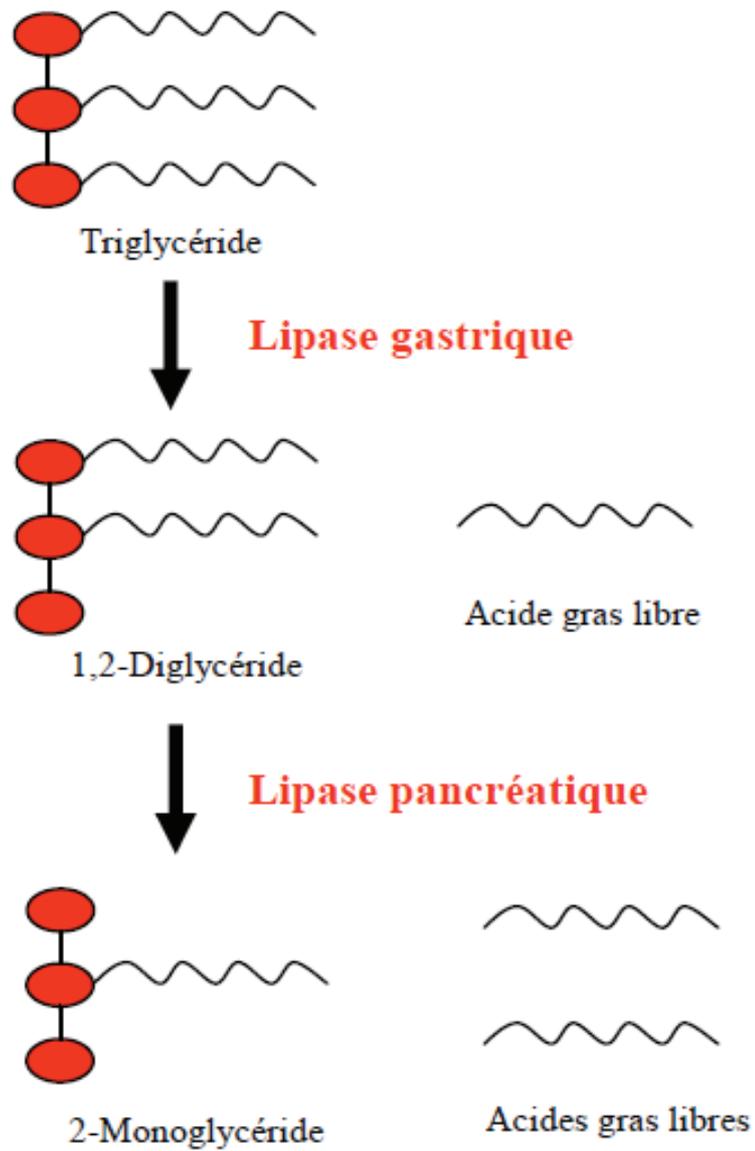


Figure 7. Hydrolyses successives d'un triglycéride alimentaire

(B12 notamment) et électrolytes ; c'est également le site majeur de réabsorption des sels biliaires (Lack 1979). Il débouche sur le gros intestin ou côlon. Il est à noter que l'arrivée des nutriments, détectée par des chemorécepteurs de la muqueuse iléale, entraîne un ralentissement de la vidange gastrique. Ce mécanisme signalant à l'estomac qu'il faut ralentir sa vidange pour permettre l'absorption des nutriments est couramment appelé le « frein iléal ».

Le **côlon** mesure 1,5 mètre et s'étend jusqu'à l'anus. Son rôle est d'absorber l'eau résiduelle, les électrolytes (sodium, magnésium, ...) et certaines vitamines. Le chyle, dépourvu alors de la quasi-totalité de ses nutriments déjà absorbés, se mélange au mucus et au microbiote intestinal ; il devient alors la matière fécale. Les fibres alimentaires non digérées dans la partie supérieure du tractus, ainsi que les sécrétions endogènes (débris cellulaires, enzymes, stérols...) sont les principales sources de carbone et d'énergie du microbiote colique. Les processus microbiens de dégradation et de fermentation de ces substrats génèrent alors la production d'une diversité de métabolites tels que les acides gras à chaîne courte (acétate, propionate, butyrate), les gaz (H_2 , CO_2 , voire méthane) ou encore l'ammoniaque. Les métabolites formés sont, pour la plupart, absorbés et utilisés par l'organisme.

Ainsi, l'appareil digestif humain est un système complexe, adapté à une digestion et une absorption efficaces des nutriments essentiels.

3.1.2. *Digestion des lipides alimentaires*

Puisque les triglycérides représentent la forme majoritaire des lipides consommés, les parties suivantes seront consacrées à leur digestion (et leur absorption en 3.2).

a) Hydrolyses successives

La digestion est, par définition, le processus physico-chimique par lequel les molécules organiques des aliments sont dégradées pour être rendues absorbables par l'intestin grêle. Les molécules lipidiques vont subir deux étapes primordiales de dégradation : une hydrolyse gastrique puis une hydrolyse duodénale (**figure 7**).

✓ Hydrolyse gastrique

Cette étape est sous la coupe de l'action d'une enzyme clé, la lipase gastrique, synthétisée par les cellules principales de l'estomac et qui présente une grande stabilité en milieu acide (pH entre 2 et 8) (DeNigris *et al.* 1985; Gargouri *et al.* 1989; Hamosh 1990). Elle est sécrétée directement sous forme active, à hauteur de 20 à 25 mg pendant la digestion d'un

repas (Carriere *et al.* 1993). Cette lipase contribue à la digestion des triglycérides alimentaires à hauteur de 5 à 37 % (Carriere *et al.* 1993). Ce taux peu important de lipolyse est dû à l'inhibition de cette hydrolyse gastrique par les acides gras libres qu'elle génère (Pafumi *et al.* 2002). La lipolyse gastrique joue, néanmoins, un rôle non négligeable sur le plan qualitatif. En effet, elle permet, dans un premier temps, de générer des molécules tensio-actives telles que les acides gras ou les diglycérides, suite à l'hydrolyse des triglycérides. Ces molécules participent au processus gastrique d'émulsification des lipides, processus permettant une meilleure accessibilité des lipides aux lipases (gouttelettes lipidiques avec interface importante). Dans un second temps, l'hydrolyse gastrique engendre la libération d'acides gras à chaînes courte et moyenne qui représentent une source d'énergie rapidement utilisable par l'organisme, puisque ces acides gras, plus hydrosolubles, peuvent être directement absorbés (cf. Chap.1, § 3.2.1). Enfin, dans un troisième temps, la lipolyse gastrique va conditionner l'activité ultérieure de la lipase pancréatique, comme suit :

- l'émulsification n'ayant plus lieu dans l'intestin, la formation de gouttelettes ou globules lipidiques dans l'estomac est primordiale (Armand *et al.* 1996). La taille des gouttelettes obtenue est relativement bien conservée dans le duodénum et cette structure émulsionnée permet à la lipase pancréatique d'avoir une meilleure efficacité lipolytique (Borel *et al.* 1994; Armand *et al.* 1996) ;

- les acides gras, générés après hydrolyse gastrique, vont stimuler, une fois en contact avec la muqueuse duodénale, la sécrétion de cholécystokinine (CCK) (Guimbaud *et al.* 1997; Matzinger *et al.* 2000) ; celle-ci inhibe à son tour la vidange gastrique (Liddle *et al.* 1986) et active la sécrétion des enzymes pancréatiques (Hildebrand *et al.* 1990), préparant ainsi la suite de la digestion ;

- les acides gras libérés au cours de l'hydrolyse gastrique permettent d'activer le complexe lipase-colipase pancréatique, par interaction avec l'enzyme et/ou son site de liaison ; cette activation est néanmoins dépendante de la nature des acides gras générés (Hamosh 1990; Borel *et al.* 1994).

- les diglycérides, générés par l'action de la lipase gastrique, sont facilement et rapidement hydrolysables par la lipase pancréatique compte tenu de leur localisation davantage en surface sur les gouttelettes lipidiques (comparé aux TG enfouis).

L'hydrolyse gastrique, *via* l'action de la lipase gastrique, joue donc un rôle significatif dans la digestion des lipides chez l'Homme, et nous allons voir comment la lipase pancréatique prend le relais pour l'hydrolyse duodénale.

✓ Hydrolyse duodénale

La CCK, dont la sécrétion duodénale a été déclenchée par l'arrivée des AG libérés (Guimbaud *et al.* 1997; Matzinger *et al.* 2000), agit directement sur le pancréas en stimulant la sécrétion du suc pancréatique et sur la vésicule biliaire en provoquant sa contraction et donc la libération de la bile (Hildebrand *et al.* 1990). Le suc pancréatique est riche en enzymes digestives dont la lipase pancréatique, qui va pouvoir terminer l'hydrolyse des tri- et di-glycérides restants et permettre ainsi d'obtenir les produits finaux de digestion que sont les acides gras libres et les monoglycérides. L'activité de la lipase pancréatique s'exerce à l'interface hydrophile-hydrophobe des gouttelettes et nécessite la présence d'une colipase qui sert d'ancrage à la lipase pancréatique (Borgstrom 1975; Wilde *et al.* 2011). De plus, cette colipase est le seul agent connu à ce jour capable de lever l'inhibition exercée par les sels biliaires et les AG libres générés sur l'hydrolyse duodénale des triglycérides.

L'hydrolyse duodénale contribue à la digestion des triglycérides alimentaires à hauteur de 40 à 73 % (Carriere *et al.* 1993). Parallèlement, lors de cette digestion duodénale, l'hydrolyse des phospholipides et des esters de cholestérol alimentaires est réalisée sous l'action respective de la phospholipase A2 et de la cholestérol estérase (toutes deux pancréatiques) ; des acides gras libres, des lysophospholipides et du cholestérol libre sont ainsi produits.

b) Micellisation des produits d'hydrolyse

Les acides gras et les monoglycérides, produits par les deux hydrolyses successives, sont associés aux sels biliaires pour former des micelles mixtes. La solubilité des acides gras à longue chaîne et des monoglycérides est extrêmement faible en milieu aqueux mais cette forme micellaire améliore leur solubilité et leur transport jusqu'aux cellules entérocytaires.

Les acides gras à chaînes courte et moyenne sont, quant à eux, plus hydrosolubles que les acides gras à longue chaîne, et ne nécessitent donc pas la présence de sels biliaires pour être absorbés.

c) Importance des différents niveaux de structure de la matière grasse

Les triglycérides alimentaires se présentent sous la forme d'une chaîne hydrocarbonée, avec 3 positions possibles d'estérification des acides gras (*sn*-1, 2 ou 3). Un acide gras est alors hydrolysé différemment selon la position qu'il occupe sur le glycérol. Effectivement, la lipase gastrique lyse préférentiellement les acides gras qui sont estérifiés en position externe *sn*-3, tandis que la lipase pancréatique lyse plutôt les deux positions externes, *sn*-1 et *sn*-3 (Verger 1980; Carriere *et al.* 2000; Mu *et al.* 2004). Ces caractéristiques lipasiques ont leur

importance et nous verrons qu'elles participent à la notion de bioaccessibilité des acides gras et, par conséquent, qu'elles ont des répercussions au niveau absorbatif (cf. Chap.1, § 3.2.4).

En outre, la distribution de taille des gouttelettes lipidiques a un impact sur l'efficacité d'hydrolyse par les lipases. En effet, il a été montré chez l'animal (Borel *et al.* 1994), puis chez l'homme sain (Armand *et al.* 1999), qu'une émulsion de granulométrie fine (0,7 μm) est plus efficacement hydrolysée, notamment durant la phase gastrique, comparée à une émulsion plus grossière (10 μm). Cette différence d'hydrolyse s'explique notamment par le fait qu'une émulsion fine présente une interface lipidique plus importante, donc davantage de « zone d'accès » pour les lipases. De plus, les lipases étant en excès par rapport à leur substrat en conditions physiologiques, l'augmentation de la surface interfaciale disponible ne peut que permettre la fixation d'un plus grand nombre de lipases. Enfin, les acides gras libres générés encombrant la surface des gouttelettes, et ce d'autant plus rapidement que celle-ci est faible ; les AG libres inhibent alors la lipase gastrique mais ce phénomène peut être ralenti par la présence de petites gouttelettes (plus grande interface).

Par ailleurs, dans le cas des structures émulsionnées, la composition de l'interface lipides/eau est un paramètre qui joue un rôle non négligeable dans la digestion, et ce, à deux niveaux : d'une part, en conditionnant la stabilité gastrique, et d'autre part, en affectant l'activité des lipases gastro-intestinales.

La nature du surfactant (ou émulsifiant) peut affecter le comportement des émulsions, notamment leur changement de structure selon les conditions physico-chimiques du tractus digestif (Hur *et al.* 2009). En effet, les émulsions sont sujettes à des phénomènes de déstabilisation physique (crémage, floculation, coalescence) et/ou chimique (oxydation, hydrolyse), qui peuvent à terme provoquer leur rupture. En conditions gastriques et duodénales, les variations de pH, la présence d'enzymes protéolytiques et lipolytiques ainsi que l'apparition de nombreux produits d'hydrolyse sont d'autant de facteurs participant à la déstabilisation des émulsions (Golding *et al.* 2010; Golding *et al.* 2011). L'influence de la nature de l'agent émulsifiant sur la stabilité gastro-intestinale a été largement étudiée. Cependant, les études menées indiquent parfois des résultats différents, et nous pouvons penser que les conditions expérimentales y jouent pour beaucoup. En effet, il est à noter que les caractéristiques des méthodes *in vitro* utilisées diffèrent souvent entre les études, visant pourtant toutes à démontrer l'impact de la nature de l'émulsifiant. On remarquera, par exemple, que les caractéristiques initiales des gouttelettes d'émulsion (taille, concentration, nature de l'huile) mais aussi la composition des fluides simulant les conditions gastro-intestinales (acides biliaires, lipases, acides gras, lysophospholipides, minéraux) ne sont pas

toujours identiques entre les études. Concernant la stabilité gastrique, notamment par rapport au pH acide, les émulsions stabilisées avec des surfactants de faible poids moléculaire (phospholipides, monoglycérides) seraient stables en condition acide et non affectées par l'environnement gastrique (Singh *et al.* 2009). Par ailleurs, compte tenu de la protéolyse importante réalisée par les protéases gastriques, les émulsions stabilisées par des protéines seraient moins stables dans l'estomac que des émulsions formulées avec des phospholipides (Singh *et al.* 2009; Golding *et al.* 2010; Golding *et al.* 2011). En effet, la pepsine peut hydrolyser les protéines du lactosérum adsorbées à l'interface, telles que la β -lactoglobuline ou la lactoferrine, entraînant alors une diminution de la tension interfaciale et, à terme, la floculation (rapprochement des gouttelettes en amas mais pas de fusion de leur contenu) voire la coalescence (fusion des gouttelettes) des émulsions concernées (Singh *et al.* 2011). Les interfaces stabilisées par des β -caséines subissent également une hydrolyse gastrique par la pepsine, cause majeure de la déstabilisation observée (Singh *et al.* 2011). Cependant, il faut noter que de nombreux réarrangements de l'interface ont lieu en conditions physiologiques, pouvant conduire à la co-présence de différents surfactants (Singh *et al.* 2009; McClements *et al.* 2012) ; il est donc rare de trouver des gouttelettes d'émulsion stabilisées par un seul type d'émulsifiant au cours de son passage dans le tractus gastro-intestinal. L'impact de l'agent émulsifiant reste primordial en tout cas, au vu des travaux de Marciani et ses collaborateurs qui ont réussi à formuler deux émulsions, l'une stable et l'autre instable en conditions gastriques, en ne jouant que sur la nature du surfactant (additifs alimentaires : monostéarate de sorbitane vs monooléate de sorbitane), montrant aussi l'impact de la stabilité physicochimique des émulsions sur les vidanges gastrique et biliaire ainsi que sur la lipémie et la satiété postprandiales (Marciani *et al.* 2007; Marciani *et al.* 2009).

La composition de l'interface est aussi un élément important impliqué dans l'efficacité de l'hydrolyse des TG par les lipases. De la même manière que précédemment, nous allons voir que les résultats sont parfois contradictoires entre les études, l'hétérogénéité des méthodes pouvant, en partie, en être la cause. L'équipe de Julian McClements montre que la résistance à la lipolyse des gouttelettes lipidiques initialement stabilisées par différents surfactants diminue dans l'ordre suivant : surfactant non-ionique (Tween 20) > phospholipides (lécithine) > protéines (caséinate et protéines de lactosérum) (Mun *et al.* 2007). Ainsi, dans leur étude, la lipolyse *in vitro* par la lipase pancréatique d'huile de soja émulsionnée est augmentée lorsque celle-ci est stabilisée par des protéines laitières plutôt que par des phospholipides, et ce en présence de sels biliaires (Mun *et al.* 2007). Dans le même esprit, Armand et ses collaborateurs ont montré que l'ajout de protéines sériques ou de caséines à l'interface d'une

Tableau 2. Récapitulatif de l'impact des structures moléculaire et supramoléculaire des lipides sur les étapes de digestion gastrique et pancréatique

	Hydrolyse gastrique	Hydrolyse pancréatique
Structure moléculaire		
Position <i>sn</i> -1, 2, 3 sur TG	++ pour <i>sn</i> -3	++ pour <i>sn</i> -1,3
Structure supramoléculaire		
Propriétés thermiques / SFC à 37°C	∨ si SFC élevé	∨ si SFC élevé
Emulsions :		
- taille gouttelettes	↗ si taille faible	↗ si taille faible
- nature du surfactant	Variables selon protéines ou lipides polaires à l'interface	
	Stabilité gastrique des émulsions affectée par la nature du surfactant	

SFC : solid fat content ; TG : triglycéride

émulsion améliore significativement l'action lipolytique des lipases (Armand 2008). Par ailleurs, la nature même des phospholipides a un impact sur l'activité lipasique ; en effet, la lipase gastrique humaine présente une plus grande activité lorsque les gouttelettes lipidiques sont stabilisées par de la phosphatidylcholine (PC), du phosphatidylinositol (PI) ou encore de la phosphatidylsérine (PS) par comparaison à la phosphatidyléthanolamine (PE) ou à la sphingomyéline (Fave *et al.* 2007), comme émulsifiants. Cependant, en se plaçant dans un modèle complet de digestion *in vitro* incluant les étapes gastriques et pancréatiques, nous avons récemment montré que des émulsions alimentaires formulées avec de la lécithine de soja sont davantage hydrolysées que celles stabilisées avec du caséinate de sodium (Vors *et al.* 2012). Une étude antérieure avait également mis en évidence que des gouttelettes lipidiques recouvertes par des phospholipides étaient facilement et rapidement digérées en présence de sels biliaires (Wickham *et al.* 1998). De plus, les émulsions stabilisées par des protéines laitières présentent tout de même une stabilité à des pH compris entre 3 et 7, et ce grâce à l'action conjointe de la lactoferrine et des caséinates (Lesmes *et al.* 2010). L'équipe de Matt Golding a également montré que des émulsions stables au départ peuvent subir une floculation précoce en conditions gastriques et que celles stabilisées par de la β -lactoglobuline étaient stables face à la coalescence en conditions gastriques et duodénales (Golding *et al.* 2010). Malgré une certaine divergence des résultats, l'ensemble de ces études montrent l'importance de l'agent émulsifiant quant à la stabilité et à la digestion des émulsions.

Enfin, les propriétés thermiques des triglycérides peuvent également avoir un impact sur leur digestion. En effet, certaines matières grasses contiennent des acides gras dont le point de fusion est élevé (par exemple, l'acide palmitique ou l'acide stéarique). Les triglycérides, portant de tels acides gras, présentent alors un point de fusion supérieur à la température corporelle ($> 37^{\circ}\text{C}$) et sont encore partiellement solides dans le tractus digestif, ce qui limite l'activité des lipases (Berry *et al.* 2005; Berry *et al.* 2007). Il a d'ailleurs été montré, *in vitro*, qu'une émulsion préparée avec de la tripalmitine (TG avec 3 acides palmitiques estérifiés sur le glycérol) sous forme solide (cristallisée) est moins bien lipolysée par la lipase pancréatique que la même émulsion réalisée avec des TG sous forme liquide (Bonnaire *et al.* 2008).

L'ensemble des facteurs influençant les étapes d'hydrolyses gastrique et pancréatique sont résumés dans le **tableau 2**, ci-contre.

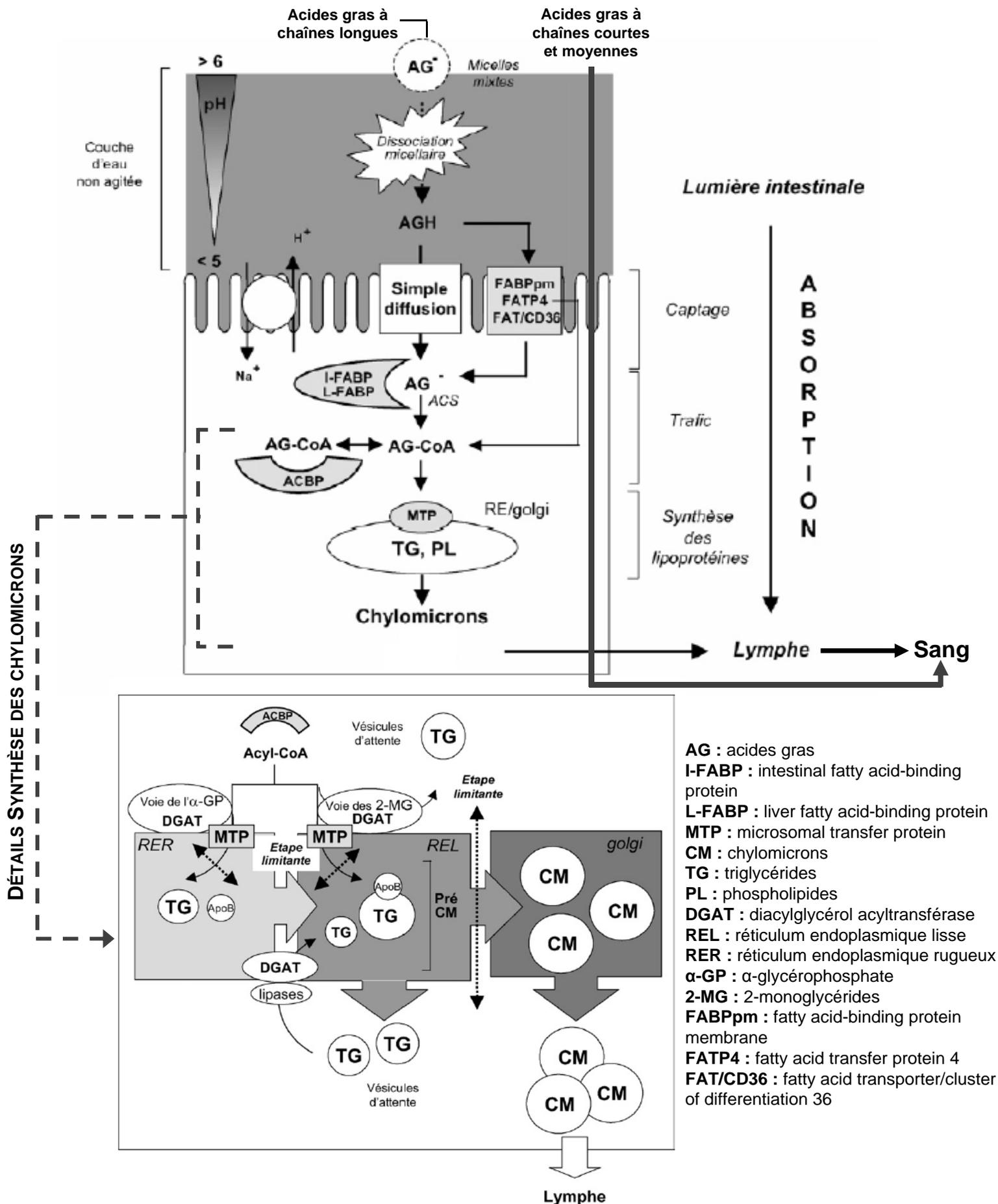


Figure 8. Captage, devenir intra-entérocytaire des acides gras et synthèse des chylomicrons (modifié d'après Petit *et al.* 2007). La figure est commentée étape par étape en 3.2.1 & 3.2.2, ci-contre.

3.2. Absorption intestinale des lipides alimentaires

L'absorption intestinale des micelles mixtes d'acides gras à longue chaîne (AGLC) est classiquement décomposée en trois étapes successives : captage apical, trafic intracellulaire et contribution à la synthèse de lipoprotéines (chylomicrons) (**figure 8**).

3.2.1. Captage et trafic entérocytaires des acides gras

Le captage réside dans le passage des AGLC et monoglycérides depuis la lumière intestinale (sous forme de micelles) vers le cytoplasme des entérocytes. Ces dernières ont la particularité de présenter un micro-environnement spécifique au niveau de leur bordure en brosse (pôle apical) : la couche d'eau non agitée (**figure 8**). Celle-ci se caractérise par un gradient de pH maintenu grâce aux pompes à protons localisées au niveau de la membrane apicale des cellules intestinales (Shiau *et al.* 1985). Lorsque le pH de la couche d'eau devient inférieur au pKa (pH auquel un acide est dissocié à 50%) des AGLC, ces derniers se protonent et entraînent la dissociation des micelles mixtes d'AGLC, permettant ainsi le captage apical par simple diffusion des AGLC et des monoglycérides (Kamp *et al.* 1993). Les sels biliaires repartent, quant à eux, dans la lumière intestinale. La diffusion passive est ainsi un transport à faible affinité mais à grande capacité, tout à fait adapté lors d'apports importants en lipides, comme en période postprandiale.

Néanmoins, certains auteurs ont démontré l'existence d'un captage saturable des AGLC ainsi que des inhibitions compétitives entre eux (Stremmel 1988), suggérant un transport facilité, en plus de la simple diffusion. Ce transport facilité prendrait alors place en présence de faibles quantités d'AGLC, notamment en période interprandiale ou de jeûne. Les protéines intestinales FABPm (Fatty Acid-Binding Protein membrane), FAT/CD36 (Fatty Acid Transporter/Cluster of Differentiation 36), FATP4 (Fatty Acid Transfer Protein 4) et la cavéoline-1, regroupées sous le nom générique de lipid-binding proteins, seraient responsables d'un tel transport, compte tenu de leur forte affinité pour les AGLC et de leur présence intestinale (Stremmel *et al.* 1985; Trigatti *et al.* 1991; Abumrad *et al.* 1993; Schaffer *et al.* 1994). Ainsi, certains auteurs se sont accordés à dire que deux types de transport coexisteraient au niveau entérocytaire (Chow *et al.* 1979; Stremmel 1988) : l'un, servant de système prépondérant en postprandial afin d'éviter que le captage soit une étape limitante (cas de la diffusion passive), et l'autre, avec une plus forte affinité pour les AGLC, permettant d'assurer un captage moins intense en interprandial (cas du transport facilité par protéines

spécifiques). Des données plus récentes de la littérature remettent cependant en question la fonction de transporteur en tant que tel de ces protéines ; elles ne présenteraient pas vraiment les caractéristiques de transporteurs membranaires efficaces mais auraient davantage un rôle permissif et indirect dû à des conditions favorables de gradient de concentration (Petit *et al.* 2007).

Une fois dans la cellule entérocytaire, les AGLC sont pris en charge par deux formes de FABP (fatty acid binding protein), exprimées simultanément dans l'intestin grêle, la I-FABP (intestinal- FABP) et la L-FABP (liver-FABP) (**figure 8**). Ces deux protéines sont capables de lier les AGLC de manière réversible : la I-FABP n'en lie qu'un seul tandis que la L-FABP peut en lier deux. La L-FABP est également capable de lier des monoglycérides. Ces deux FABP transfèrent ensuite les AGLC et les monoglycérides vers les différents organites (RE, Golgi) entérocytaires.

Pour être métabolisés, les AGLC doivent d'abord être activés en acyl-CoA via l'action des acyl-CoA synthétases (ACS), localisées au niveau membranaire des organites (Tanaka *et al.* 1979). Une fois synthétisés, ces acyl-CoA peuvent suivre deux voies métaboliques dans l'entérocyte (**figure 8**) :

- estérification dans le RE,
- oxydation dans les mitochondries.

En cas de digestion, en période postprandiale, les acyl-CoA sont alors préférentiellement orientés vers la voie d'estérification permettant la synthèse des TG et de phospholipides. Cette ré-estérification peut alors elle-même être réalisée via deux voies différentes : celle des 2-monoglycérides et celle de l' α -glycérophosphate (**figure 8**).

En période postprandiale, la voie des 2-monoglycérides est prépondérante. Celle-ci conduit à la ré-estérification des 2-monoglycérides, en présence d'acyl-CoA, en 1,2-diglycérides puis en triglycérides sous l'action respective de la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT) et de la diacylglycérol acyltransférase (DGAT) (Black 2007). Les phospholipides sont formés, en parallèle, à partir des diglycérides par la phosphocholine diacylglycérol-acyltransférase.

En période interprandiale ou de jeûne, la voie de l' α -glycérophosphate, alors majoritaire, utilise l' α -glycérophosphate comme accepteur d'acyl-CoA pour former de l'acide phosphatidique, puis du 1,2-diacylglycérol qui est ensuite estérifié, soit par la DGAT en TG, soit par la phosphocholine diacylglycérol-acyltransférase en phospholipides (Black 2007).

Concernant les acides gras à chaînes courte et moyenne, ils se présentent sous forme libre aux entérocytes et sont absorbés par diffusion passive, pour rejoindre directement la circulation sanguine au niveau de la veine porte, qui les transporte vers le foie (**figure 8**).

3.2.2. Synthèse et sécrétion des chylomicrons

L'intestin synthétise majoritairement des chylomicrons en période postprandiale. Seuls les mécanismes impliqués dans la synthèse de ce type de lipoprotéines seront détaillés.

Les TG néosynthétisés sont transférés vers la lumière du réticulum endoplasmique rugueux (RER) grâce à une enzyme clé, la microsomal triglyceride transfer protein ou MTP (Lin *et al.* 1994) (**figure 8**). Cette enzyme est capable de catalyser le transfert des lipides (essentiellement des triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol) de la membrane du RER vers l'apoB48 en cours de traduction. L'addition de lipides à l'ApoB48 permet la libération de l'apolipoprotéine dans la lumière du réticulum endoplasmique (Hussain *et al.* 2005). Il se forme alors des chylomicrons primordiaux. Ces derniers vont s'enrichir en TG, phospholipides et esters de cholestérol (EC), par fusion avec des gouttelettes de TG dépourvues d'apolipoprotéines formées indépendamment dans le RE, pour ainsi devenir des pré-chylomicrons dans le réticulum endoplasmique lisse (REL) (Hussain *et al.* 2005). Ces chylomicrons naissants (ou lipoprotéines intermédiaires) quittent ensuite le REL, via un transport vésiculaire (prechylomicron transport vesicle, PCTV), pour rejoindre l'appareil de Golgi (Hussain *et al.* 2005) (Black 2007). Les vésicules golgiennes transportant les chylomicrons fusionnent avec la membrane plasmique basolatérale des entérocytes (**figure 8**) permettant ainsi leur exocytose et leur sécrétion dans la lymphe *via* les canaux chylifères.

Ces chylomicrons « natifs » ne sont encore pas pour autant matures. En effet, ils rejoignent ensuite la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière, via le canal thoracique, où ils acquièrent de nouvelles apolipoprotéines (ApoE ; ApoCI, CII, CIII) par échange avec les HDL (Goldberg *et al.* 1990), indispensables pour la suite de leur métabolisme.

Enfin, il faut noter que ce système d'absorption est très efficace puisque seulement 5% en moyenne des lipides alimentaires ingérés sont perdus dans les selles, chez un individu sain (Murphy *et al.* 1995).

3.2.3. *Stockage entérocytaire des lipides*

La présence de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules entérocytaires a été mise en évidence chez l'Homme sain (Robertson *et al.* 2003). Notre intestin serait capable de stocker transitoirement une certaine proportion de triglycérides, notamment après un repas riche en lipides. Lors de l'ingestion d'un second repas, la mobilisation de ces TG stockés est stimulée, provoquant alors la sécrétion de néo-chylomicrons qui résulte en une augmentation rapide de la lipémie (Robertson *et al.* 2003). En effet, l'apparition de triglycérides au bout de 10-30 min dans la circulation sanguine est observée avant même que l'absorption des lipides alimentaires du repas n'ait réellement pu avoir eu lieu dans les entérocytes ; après l'ingestion du repas standard, la lipémie postprandiale est connue pour augmenter durant les 2-3 premières heures, pouvant atteindre un plateau entre 3 et 4 heures (pic en moyenne vers 3h), puis retourne à la normale au bout de 6 heures (Lairon *et al.* 2007). Il a récemment été montré, via l'utilisation d'isotopes stables, que 10-12 % des TG consommés lors du repas de la veille se retrouvaient dans les chylomicrons néo-synthétisés, apparaissant 15-20 min après le début du petit-déjeuner (Chavez-Jauregui *et al.* 2010). Cette observation indique que le temps de stockage des TG dans le pool intra-entérocytaire peut s'étendre jusqu'à 16h au moins, et soutiendrait l'existence d'une stimulation par le goût du gras. De la même manière, l'effet « second repas » dans la journée suggère aussi la notion de stockage entérocytaire (pool de TG). En effet, l'homme mange rarement une seule fois dans la journée et la consommation d'un nouveau repas engendre une concentration en TG (des chylomicrons) plus élevée que celle apparut après le premier repas, même si les deux repas sont identiques. La présence dans les chylomicrons du second repas d'une quantité significative de lipides provenant du premier repas a été mise en évidence et rapporté comme « effet second repas » (Evans *et al.* 1998; Heath *et al.* 2007; Maillot *et al.* 2008).

3.2.4. *Importance de la structure lipidique*

La structure moléculaire des acides gras, notamment leur longueur de chaîne, a un impact direct sur leur absorption. En effet, il est à noter que les acides gras courts et moyens ne passent pas par toutes les étapes d'absorption car, étant plus hydrosolubles que les AGLC, ils ne sont pas micellisés et sont donc directement absorbés par voie passive pour rejoindre la circulation sanguine. C'est le cas des 10-15% d'acides gras à chaîne courte de la matière grasse laitière des ruminants, localisés principalement en position *sn*-3, et directement absorbés vers la veine porte pour être orientés vers la β -oxydation, dans le foie, pour leur utilisation sous forme d'énergie (Small 1991).

L'absorption peut également être modulée par la structure moléculaire des triglycérides. Lors de l'hydrolyse des TG, les acides gras générés, notamment les saturés, ont la capacité à former des savons en se complexant au calcium (Lorenzen *et al.* 2007). L'efficacité d'absorption de ces acides gras va alors dépendre de leur faculté à former des savons calciques (éliminés dans les selles) ou à être incorporés aux micelles mixtes. Ces acides gras, moins susceptibles d'être absorbés du fait de leur interaction avec le calcium et la formation de savons insolubles excrétés dans les fèces, sont des acides gras saturés à chaîne longue et estérifiés en position *sn-1* et *sn-3*. En revanche, les acides gras saturés positionnés en *sn-2* sur les molécules de TG sont dits « bioaccessibles » car, les lipases n'hydrolysant pas à cette position (cf. Chap.1, § 3.1.2.a), ils vont rester estérifiés en monoglycérides et ne pas être éliminés sous la forme de savons calciques. Cette conservation de position va même plus loin et concerne l'ensemble des AG, puisqu'il a été montré que 75% des acides gras situés en position *sn-2* dans les triglycérides alimentaires sont maintenus en position *sn-2* dans les triglycérides des chylomicrons (Armand 2007). Les acides gras saturés situés en position centrale *sn-2* sont donc très souvent conservés et mieux absorbés que s'ils étaient placés en position externe sur les TG. Des études ont justement comparé différentes sources de matière grasse naturelle, se distinguant par la position de leur AG (notamment saturés) sur les TG. Il a ainsi été montré, chez le rat, que la consommation de beurre de cacao ou d'huile de palme (dont les acides gras saturés des TG sont essentiellement positionnés en positions externes) induisait une réduction de l'absorption des acides gras au bout de 8 et 24 heures de temps, par rapport à la consommation de saindoux (dont les acides gras saturés sont davantage positionnés en position interne) (Porsgaard *et al.* 2000; Raynal-Ljutovac *et al.* 2011).

Nous devons alors noter que les données sur le rôle de la structure moléculaire des lipides ont été mises à profit pour la fabrication, par interestérisation, de triglycérides dits « structurés ». Cette technique consiste à réarranger les acides gras d'une position à une autre sur le glycérol, au sein d'un même triglycéride ou entre deux triglycérides, et ce, par voie chimique ou enzymatique (Berry 2009). Elle permet ainsi de lever la distribution aléatoire des acides gras. Cette technique d'interestérisation a ainsi permis de structurer des huiles différemment, notamment en augmentant la part des acides gras en position *sn-2* en vue d'une meilleure absorption, par exemple. C'est le cas d'une étude chez le rat où l'augmentation d'acide palmitique en position interne par interestérisation d'huile de coprah et d'oléine de palme améliore nettement l'absorption lipidique par les animaux (moins de perte fécale en AGS après plusieurs jours de régime (Lien *et al.* 1993). Des résultats similaires ont également été obtenus chez le rat avec des acides gras polyinsaturés, montrant alors une meilleure

Tableau 3. Récapitulatif de l'impact des structures moléculaire et supramoléculaire des lipides sur l'étape d'absorption intestinale

Absorption intestinale	
Structure moléculaire	
Longueur de chaîne des AG	Directe pour AG courts et moyens
Position <i>sn</i> -1, 2, 3 sur TG	✓ ++ pour AG en <i>sn</i> -2 ✓ Diminuée par formation de savons calciques à cause d'AG saturés et longs en <i>sn</i> -1,3 (nourrisson)
SFC à 37°C & Position <i>sn</i> -1, 2, 3	Diminuée si le SFC est augmenté en raison d'AG en <i>position</i> ?
Structure supramoléculaire	
Propriétés thermiques / SFC	↘ si SFC élevé car formation de cristaux de MG
Emulsions :	
- taille gouttelettes	↗ si taille faible car hydrolyse ↗ mais frein possible par la CCK

AG : acide gras ; CCK : cholécystokinine ; MG : matière grasse ; SFC : solid fat content ; TG : triglycéride

absorption des AGPI lorsqu'ils sont préférentiellement positionnés en *sn-2* (Christensen *et al.* 1995). Nous verrons également que ces triglycérides ou matières grasses « structurés sur mesure » peuvent avoir un impact direct sur la lipémie postprandiale (cf. Chap.1, § 4.1.3).

L'importance de la structure intermoléculaire des TG et de la position interne (*sn-2*) sur l'absorption lipidique a ainsi été observée chez l'animal, mais aussi *in vitro* et chez le nouveau-né (Filer *et al.* 1969; Jandacek *et al.* 1987; Innis *et al.* 1994), en utilisant notamment la technique d'interestérisation. Cependant, il est important de souligner que, chez l'Homme adulte, les études réalisées ne semblent pas confirmer ces observations, et certaines montrent que les acides palmitique et stéarique seraient bien absorbés, indépendamment de leur position sur les TG (Bonanome *et al.* 1988; Baer *et al.* 2003; Berry *et al.* 2007). En revanche, l'absorption des lipides chez les adultes apparaît davantage corrélée au pourcentage de SFC à 37°C (température corporelle). Les matières grasses contenant des acides gras à haut point de fusion comme l'acide stéarique sont moins bien hydrolysées par les lipases (cf. Chap.1, § 3.1.2.c) et seraient donc également moins bien absorbées (Berry *et al.* 2007). En effet, le haut point de fusion des triglycérides riches en acides palmitique ou stéarique se traduit par un SFC plus élevé à 37°C, responsable de la faible absorption des AG (Berry *et al.* 2005; Berry 2009). La lipémie résultante en est d'autant modifiée (cf. Chap.1, § 4.1.3). De nouvelles études sont donc nécessaires afin de mieux identifier l'impact relatif des propriétés thermiques (SFC) et de la position des AG en *sn-2* sur l'absorption lipidique.

Concernant la taille des gouttelettes lipidiques, nous avons vu que plus celle-ci est petite, plus l'hydrolyse digestive est augmentée (cf. Chap.1, § 3.1.2.c), ce qui va dans le sens d'une facilitation de l'absorption intestinale. Cependant, cette dernière peut être freinée par l'inhibition de la vidange gastrique induite par une stimulation de la CCK, suite à l'arrivée des acides gras libres dans le duodénum (cf. Chap.1, § 3.1.2.a). L'émulsion peut donc être vidangée plus lentement au bout d'un certain temps, entraînant un ralentissement de l'absorption intestinale.

Les différents facteurs relatés ci-dessus qui influencent l'absorption intestinale sont résumés dans le **tableau 3**, ci-contre.

3.2.5. Modèle d'absorption intestinale *in vitro* : les cellules Caco-2

Afin de mieux comprendre les aspects mécanistiques de la physiologie digestive, des modèles *in vitro* ont été développés depuis plusieurs années. Dans le cas des cellules intestinales, le modèle des Caco-2 a été largement étudié.

Il s'agit de cellules intestinales issues d'un carcinome colique humain qui développent, en culture, les caractéristiques d'entérocytes absorptifs différenciés. Cette lignée cellulaire est reconnue depuis des années comme modèle *in vitro* d'entérocytes (Hughes *et al.* 1987; Traber *et al.* 1987; Levy *et al.* 1995). Différentes souches clonées (TC7, PD7, PF11) ont été étudiées et comparées notamment vis-à-vis de leur viabilité et de leur capacité à absorber des acides gras et à sécréter des ApoB48. Ces clones de Caco-2 se sont révélés être particulièrement appropriés pour l'étude des mécanismes d'absorption des nutriments lipidiques ; la souche TC7 a alors été mise en avant pour sa capacité à sécréter des chylomicrons, à reproduire au mieux les conditions *in vivo* et à rester viable le plus longtemps possible suite à une incubation avec des acides gras (Salvini *et al.* 2002).

La synthèse de TG et de lipoprotéines par des cellules Caco-2 différenciées a fait l'objet de nombreux travaux. Luchoomun et Hussain ont démontré, dans un premier temps, que l'assemblage des chylomicrons et leur sécrétion dans des cellules Caco-2 sont réalisés de manière similaire à celle observée dans des entérocytes *in vivo* (Luchoomun *et al.* 1999). En effet, leurs travaux ont mis en évidence que, pour des cellules Caco-2 différenciées, (i) la synthèse de chylomicrons est induite après l'incubation de grandes quantités d'acide oléique (situation semblable à une période postprandiale), (ii) les chylomicrons sécrétés présentent des propriétés similaires à ceux extraits de lymphes ou de plasma, (iii) les présumés chylomicrons sont des particules très riches en TG et (4) la synthèse des chylomicrons est empêchée par du Pluronic L81 (inhibiteur spécifique de la synthèse de ces lipoprotéines). Dans un second temps, ils ont cherché à identifier les sources de lipides (TG, PL) utilisés par les cellules dans la synthèse des chylomicrons. Leur étude a finalement montré que ce sont les TG naissants (néo-synthétisés) et les PL préformés (pool de réserve) qui sont préférentiellement utilisés pour cette synthèse ; ils ont ainsi fourni une explication aux observations faites *in vivo*, à savoir que la composition en acides gras des TG (et non celle des PL) des chylomicrons, sécrétés en période postprandiale, reflète la composition en acides gras du bol alimentaire.

D'autres études ont mis en avant l'impact de la nature des acides gras sur la synthèse de lipoprotéines par la lignée Caco-2. Van Greevenbroek et collaborateurs ont ainsi montré que les cellules Caco-2 sécrètent majoritairement des lipoprotéines de type VLDL/chylomicrons, uniquement lorsqu'elles ont été incubées avec des acides gras insaturés ; une incubation avec des acides gras saturés aboutit à la synthèse de lipoprotéines de plus grande densité (IDL/LDL) (van Greevenbroek *et al.* 1996; van Greevenbroek *et al.* 2000). Les acides gras insaturés apparaissent ainsi potentiellement plus efficaces dans la stimulation de la synthèse

de TG et de la sécrétion de chylomicrons. Parmi les acides gras insaturés étudiés, l'acide oléique est généralement le plus utilisé. Il a alors été établi que l'acide oléique est capté plus efficacement lorsqu'il est apporté en présence d'un sel biliaire, le taurocholate de sodium (Ranheim *et al.* 1994). Par la suite, souhaitant mimer au plus près les conditions physiologiques, d'autres études se sont justement intéressées à la forme d'administration des acides gras. Ces derniers ne sont plus généralement couplés à la Bovine Serum Albumin (BSA) ou au taurocholate de sodium seul mais apportés sous forme de micelles mixtes, comme à leur arrivée au niveau des microvillosités intestinales (cf. Chap.1, § 3.2.1). Château et collaborateurs ont étudié différentes formulations micellaires et leur impact sur la sécrétion de lipides et de lipoprotéines par des cellules Caco-2 (Chateau *et al.* 2005). Une grande partie des études actuelles portant sur les mécanismes d'absorption des lipides alimentaires et leur régulation (Vidal *et al.* 2005; Pauquai *et al.* 2006; Bateman *et al.* 2007; Tsuzuki 2007) s'appuient donc sur ces travaux d'étude de composition micellaire menés par l'équipe du Dr Demignot. C'est ainsi que la plupart des équipes emploient généralement la même composition micellaire, à savoir à base d'acide oléique, de taurocholate de sodium, de 2-monoglycéride et de cholestérol. La seule variante consiste en l'ajout, soit de lysophospholipides, soit de phospholipides, à cette composition. L'équipe de Denis Lairon, travaillant à Marseille sur des souches TC7, utilise ainsi des micelles à base de phosphatidylcholine tandis que d'autres chercheurs emploient de la lysophosphatidylcholine (Salvini *et al.* 2002).

Ainsi, de nombreuses études *in vitro* ont été menées, sur modèle Caco-2, en utilisant des micelles mixtes « modèles ». Nous devons alors noter la nécessité de développer des modèles simulant la réelle digestion (appareils / outils d'investigation de la lipolyse avec du matériel biologique humain) de charges lipidiques (semblables à des produits alimentaires) et de tester leur absorption sur cellules Caco-2.

3.3. Microbiote intestinal résident

3.3.1. Composition et diversité

Le microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale, est l'ensemble des bactéries peuplant le tube digestif. Il se met en place progressivement au cours des deux, voire des quatre premières années de la vie (Campeotto *et al.* 2007; Palmer *et al.* 2007), âge auquel le microbiote devient stable et proche de celui de l'adulte. Les premières bactéries

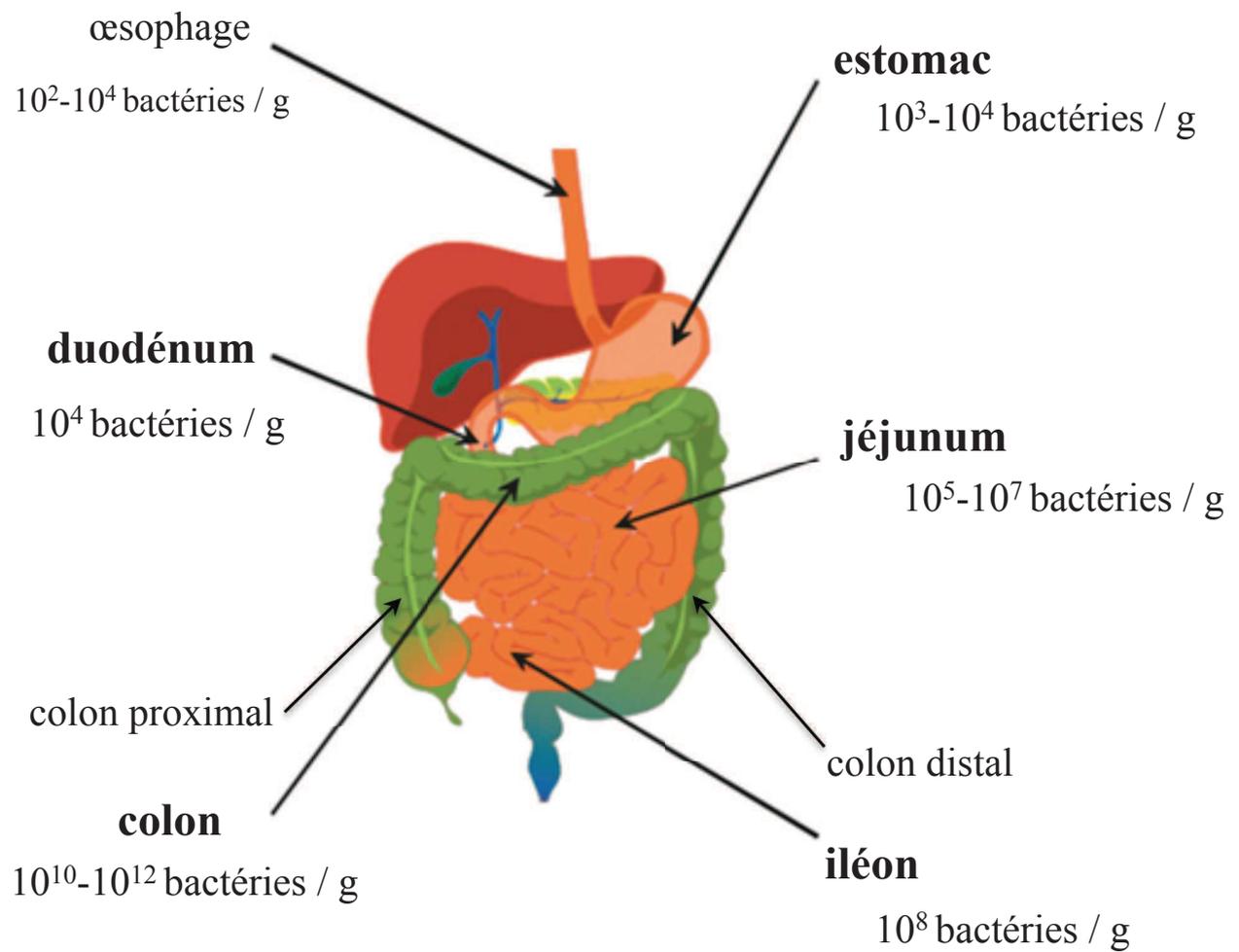


Figure 9. Schéma du tractus gastro-intestinal et son microbiote résident

colonisatrices sont des bactéries anaérobies facultatives (entérobactéries, entérocoques, staphylocoques) qui consomment l'oxygène présent. Des bactéries anaérobies strictes (appartenant aux genres *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Clostridium*...) peuvent alors s'installer et progressivement supplanter les premières colonisatrices (Favier *et al.* 2002). Cependant, certains éléments sont capables de moduler la cinétique d'implantation et de modifier ainsi la composition du microbiote intestinal du nouveau-né ; parmi ces facteurs, le mode d'accouchement (par césarienne ou voie basse), le mode d'alimentation du nouveau-né (allaitement ou lait artificiel), le sevrage ou encore le génotype.

Le nombre de bactéries colonisant le tube digestif humain augmente au fur et à mesure que l'on avance dans celui-ci (**figure 9**) : si on ne dénombre que quelques centaines de bactéries par gramme de contenu dans l'estomac, on retrouve jusqu'à 10^{11} bactéries par gramme dans le côlon distal (Savage 1977; Simon *et al.* 1984). Au total, ce sont donc plus de 10^{14} bactéries qui colonisent notre tube digestif, c'est-à-dire dix fois plus que le nombre de cellules eucaryotes constituant le corps humain (Guarner *et al.* 2003; Backhed *et al.* 2005). Il est à noter que notre tractus gastro-intestinal est également l'hôte d'eucaryotes unicellulaires tels que des levures ou des protozoaires dont l'importance, en termes de niveau de population et de fonctions, est encore mal connue.

La caractérisation du microbiote intestinal a commencé à l'aide de techniques de culture, s'appuyant sur l'utilisation de milieux sélectifs et sur le comptage des colonies bactériennes obtenues. Elles ont ainsi permis de mettre en évidence les genres bactériens dominants cultivables du microbiote fécal humain, à savoir les *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* et *Bifidobacterium* (Eckburg *et al.* 2005). Cependant, cette caractérisation traditionnelle ne peut prendre en compte qu'au maximum 30% environ des microorganismes présents (pouvant être observés et énumérés au microscope). A partir des années 1980, des techniques moléculaires fondées sur le séquençage des ARN ribosomaux ont vu le jour et ont permis d'obtenir de nouvelles informations concernant la composition et la diversité du microbiote intestinal humain. Ainsi, la majorité des espèces observées dans le microbiote fécal (2/3 environ) serait propre à chaque individu (Eckburg *et al.* 2005), indiquant alors que la diversité des espèces bactériennes intestinales serait immense à l'échelle de la planète. Les espèces observées présentent ainsi une spécificité humaine et sont en réalité associées à l'environnement digestif de manière quasi exclusive, ce qui révèle des phénomènes d'adaptation et d'évolution avec l'hôte au cours du temps (Ley *et al.* 2006). En revanche, si le microbiote semble être propre à chacun, un petit nombre d'espèces pourrait constituer un tronc commun à la plupart des individus (Tap *et al.* 2009). De même, sur le plan

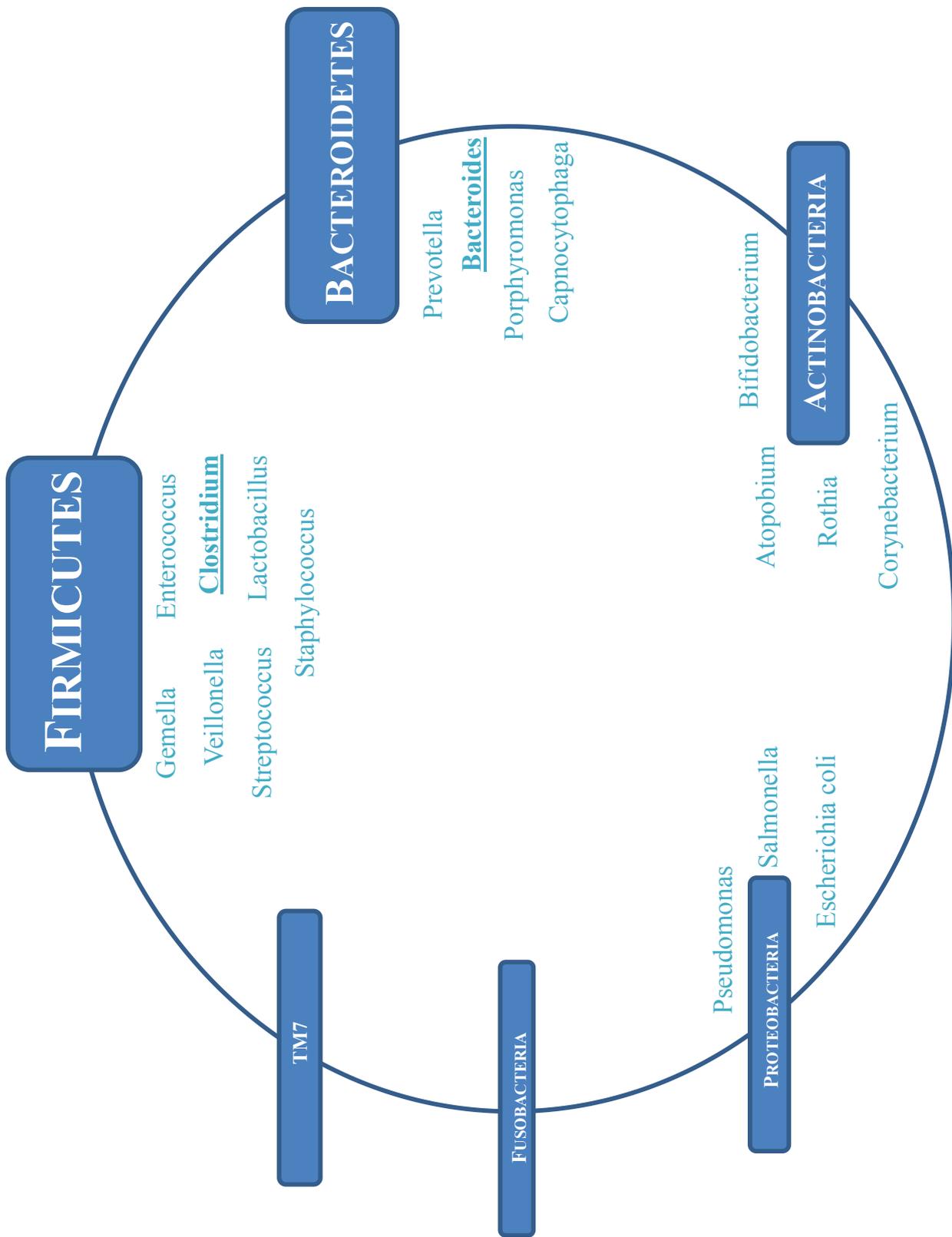


Figure 10. Phyla bactériens du microbiote gastro-intestinal humain et quelques exemples de groupes/genres bactériens qui les composent (les tailles des phyla représentés ici illustrent schématiquement leurs proportions respectives dans le texte ci-contre)

des grands groupes phylogénétiques (ou taxa), l'analyse du microbiote fait alors ressortir trois phyla bactériens, retrouvés chez l'ensemble des individus et regroupant la plus grande part des bactéries intestinales dominantes (Eckburg *et al.* 2005) (**figure 10**) :

- phylum des *Firmicutes* : il est toujours fortement représenté et réunit plus de la moitié des bactéries du microbiote intestinal ; la très grande majorité des espèces des *Firmicutes* appartient à la classe des *Clostridii*.

- phylum des *Bacteroidetes* : il partage la dominance avec le phylum précédent puisqu'il représente 10 à 30 % des bactéries du microbiote. Les espèces apparentées au genre *Bacteroides* y sont le plus représentées.

- phylum des *Actinobacteria* : il représente moins de 10 % des bactéries totales du microbiote ; on y retrouve principalement les bifidobactéries.

Trois autres phyla sont également présents dans le tractus (**figure 10**) ; il s'agit des *Proteobacteria*, *Fusobacteria* et TM7 (ce dernier n'ayant pour l'instant aucun représentant cultivable). Concernant le phylum des *Proteobacteria*, il s'agit de bactéries à Gram négatif incluant les espèces connues *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas*.

Récemment, des chercheurs du consortium européen MetaHit (Metagenomics of Human Intestinal Tract), coordonné par l'INRA de Jouy-en-Josas, ont identifié trois groupes de bactéries intestinales permettant de différencier les individus; ces signatures bactériennes sont nommées des entérotypes (Arumugam *et al.* 2011). L'analyse a porté sur 39 échantillons provenant de 3 continents (Europe, Amérique, Asie); la classification en 3 entérotypes (indépendante de l'origine géographique, de l'état de santé, du sexe et de l'âge des individus) a été déterminée par l'abondance de certains types de bactéries mais aussi par les fonctions exprimées par ces bactéries (potentiel génétique). Les auteurs expliquent que l'existence de ces entérotypes permettrait de comprendre pourquoi les effets d'un régime alimentaire ou de certains médicaments diffèrent d'une personne à l'autre. Enfin, ils soulignent la possibilité future d'utiliser l'entérotype d'un individu comme élément de diagnostic, voire de pronostic, de nombreux désordres métaboliques, liés notamment à l'obésité.

3.3.2. Fonctions du microbiote

Si la composition phylogénétique du microbiote intestinal semble varier d'un individu à l'autre, il apparaît que la majorité des fonctions qu'il exprime soient quand même partagées. En effet, le microbiote intestinal exerce des fonctions physiologiques spécifiques, dont la plupart sont bénéfiques pour l'hôte. Elles peuvent être métaboliques, trophiques et protectrices.

La fonction métabolique majeure du microbiote réside dans la fermentation des résidus alimentaires non digestibles par l'hôte. Le principal résultat de cette activité métabolique est la récupération d'énergie et de substrats assimilables pour l'hôte, sans oublier que de l'énergie et des substances nutritives servent également à la croissance et à la prolifération bactériennes.

La fermentation des glucides non digestibles (polysaccharides -amidon résistant, cellulose, hémicellulose, pectines-, oligosaccharides, sucres-alcools...) est la source majeure d'énergie dans le côlon. Une dégradation par hydrolyse de ces différents polymères en fragments plus petits (oses, oligosides...) est nécessaire et préalable au processus de fermentation. Cette dernière produit finalement des acides gras à courte chaîne (AGCC), tels que l'acétate, le propionate et le butyrate. Par ailleurs, le métabolisme anaérobie des protéines et peptides résiduels (putréfaction) produit également des AGCC mais il génère, en même temps, des substances potentiellement toxiques pour l'organisme comme de l'ammoniaque, des phénols etc. (Macfarlane *et al.* 1986; Smith *et al.* 1997).

La quantité totale de glucides et de protéines fermentescibles parvenant au côlon varie de 20 à 60 g/ jour et 5 à 20 g/ jour, respectivement, en fonction du régime alimentaire (Cummings *et al.* 1987). Les étapes d'hydrolyse et de fermentation n'ont pas lieu au même endroit : l'hydrolyse et la fermentation des glucides se révèlent plus importantes dans la partie proximale du côlon tandis que la protéolyse et la putréfaction s'établissent davantage dans la partie distale (Cummings *et al.* 1987). Pour une personne ayant un régime alimentaire de type occidental, la totalité d'AGCC produits par le microbiote représenterait jusqu'à 10% de l'énergie extraite chaque jour (McNeil 1984).

Il est à noter que lors des processus fermentaires, des quantités importantes de gaz (H₂) sont produites et en majeure partie réutilisées par le microbiote intestinal (Christl *et al.* 1992). Enfin, le microbiote joue un rôle non négligeable dans le métabolisme des stérols (cholestérol, acides biliaires, hormones stéroïdiennes), n'ayant pas tous été absorbés au niveau de l'intestin grêle (Wostmann 1973; Macdonald *et al.* 1983; Ridlon *et al.* 2006; Gerard *et al.* 2007).

Les effets trophiques du microbiote s'exercent sur la muqueuse digestive, notamment en lui fournissant des éléments assimilables comme les AGCC. En effet, il a été montré *in vivo* que ces acides gras sont capables de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales de l'intestin grêle et du côlon (Frankel *et al.* 1994). Ces AGCC participent alors indirectement au développement du système immunitaire local puisque la prolifération et la

différenciation des cellules vers le fond des cryptes donnent naissance aux cellules de Paneth, particulièrement impliquées dans l'immunité innée via la sécrétion de substances antimicrobiennes (lysozyme, défensines) (Ouellette 1997).

Enfin, un rôle de protection est exercé par le microbiote intestinal, en empêchant et en prévenant l'implantation de pathogènes. Plusieurs mécanismes qui assurent ce rôle de barrière ont été répertoriés. Par exemple, il faut savoir que les bactéries sont en compétition directe pour les sites d'adhérence situés dans la bordure en brosse des cellules épithéliales (Bernet *et al.* 1994). Certaines bactéries adhérentes non pathogènes peuvent alors prévenir l'adhérence, et donc l'entrée, de bactéries pathogènes au niveau des cellules de l'épithélium intestinal (Bernet *et al.* 1994). Par ailleurs, les bactéries entrent aussi en compétition pour l'accès aux substances nutritives dans les niches écologiques et maintiennent leur habitat collectif en produisant et en consommant leurs propres ressources (Hooper *et al.* 1999). Pour cela, les bactéries sont capables d'entretenir une relation symbiotique avec l'hôte (échanges de molécules assimilables, quantités régulées), ce qui prévient la surproduction d'un nutriment en particulier (qui pourrait favoriser l'intrusion de nouvelles bactéries compétitrices, potentiellement dangereuses). Enfin, le microbiote est capable d'inhiber la croissance de bactéries non souhaitées en produisant des substances antimicrobiennes, appelées bactériocines (Lievin *et al.* 2000). Leur rôle est néanmoins limité car ces molécules sont des protéines et donc parfois la cible des protéases digestives de l'hôte.

Ces bactéries intestinales qui nous colonisent sont ainsi responsables de fonctions essentielles au maintien de notre santé, si bien que l'on considère aujourd'hui le microbiote comme un organe à part entière de notre organisme. Il influence également notre physiologie intestinale, en participant notamment à l'angiogenèse ainsi qu'au développement et à la maturation du système immunitaire de notre intestin. Ces effets ont été démontrés au moyen d'animaux dépourvus de microbiote intestinal (animaux dits « axéniques »), dont on peut ensuite inoculer le tube digestif avec une ou plusieurs espèces bactériennes (animaux monoxéniques, conventionnalisés...). Ce modèle d'étude a permis de mettre en évidence l'implication du microbiote intestinal dans les maladies métaboliques, notamment dans l'obésité (cf. Chap.1, § 5.2.1). Le rôle joué par le microbiote serait entre autres dû à l'action de composés spécifiques pro-inflammatoires, appelés endotoxines.

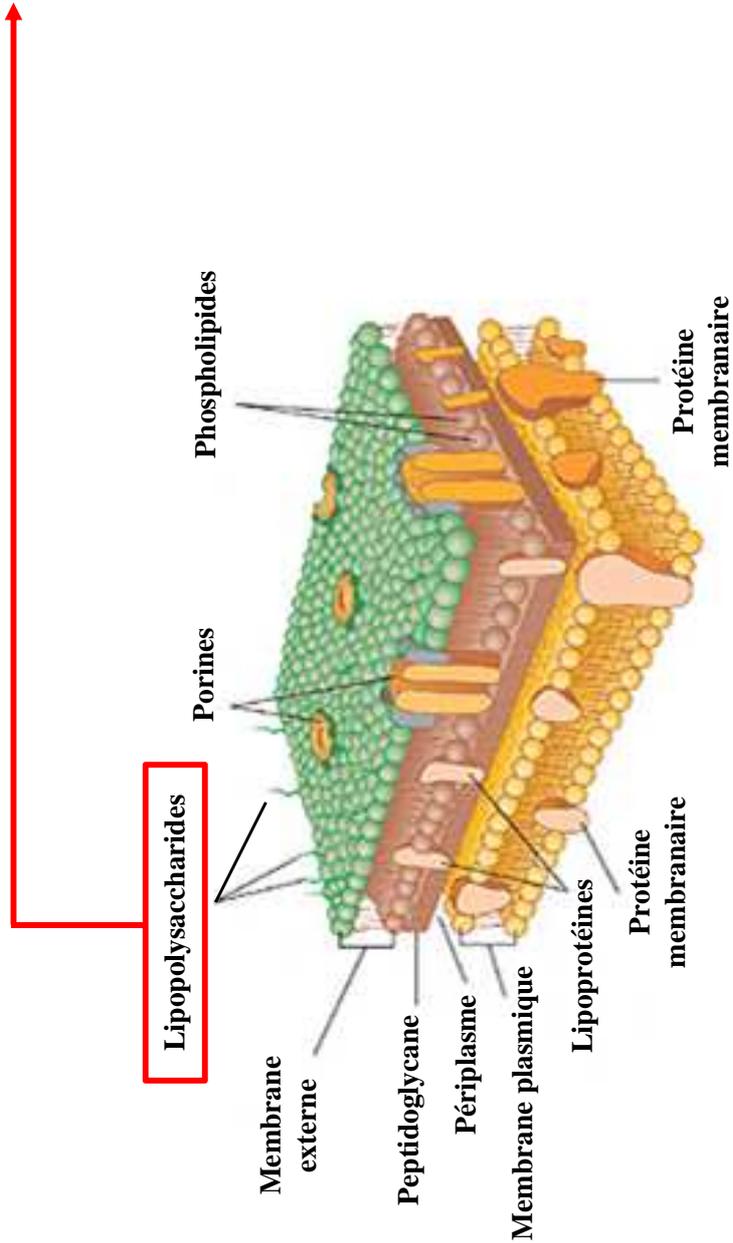
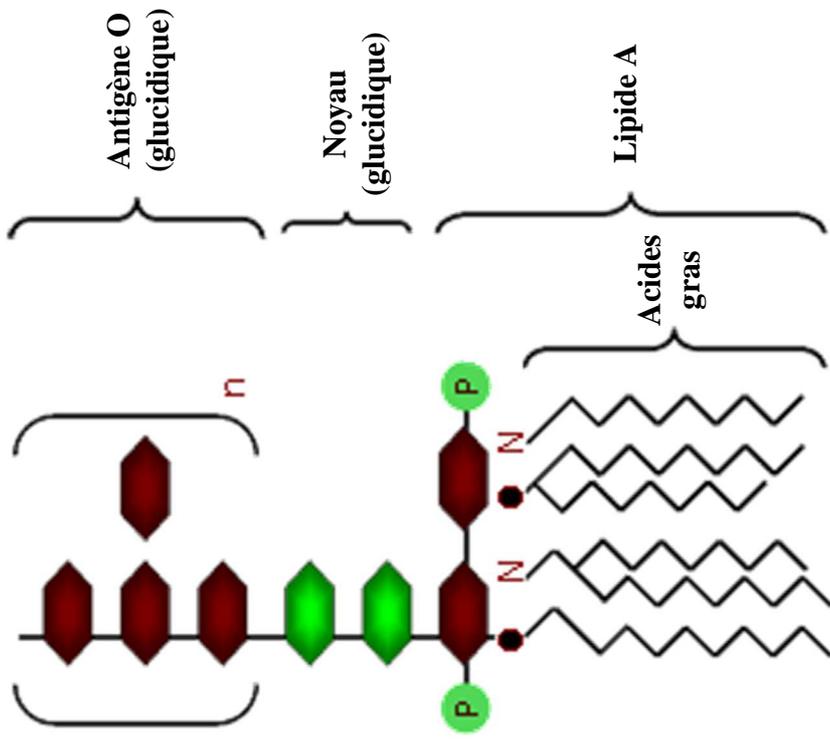


Figure 11. Structures d'une paroi de bactérie Gram négatif et d'un lipopolysaccharide bactérien

3.3.3. *Endotoxines du microbiote : structure et absorption intestinale*

Les lipopolysaccharides (LPS), appelés couramment endotoxines, sont des molécules faisant partie intégrante de la paroi des bactéries Gram négatif (**figure 11**). Ils sont constitués d'une partie lipidique complexe, appelée le lipide A, qui a la particularité de contenir des acides gras β -hydroxylés, et d'une partie polysaccharidique, elle-même composée d'un noyau et d'une chaîne O spécifique (**figure 11**). Le lipide A est responsable du pouvoir toxique inflammatoire des LPS (cf. Chap.1, § 5.2.2) tandis que la partie polysaccharidique est responsable de la spécificité antigénique O (Antigène O). Ces deux éléments de structure moléculaire varient en composition selon la souche/espèce bactérienne considérée ; il existe ainsi une multitude de molécules de LPS différentes, dont l'activité biologique diffère du fait de leur structure, expliquant pourquoi certaines bactéries sont plus ou moins virulentes (différentes revues traitent de ce sujet de manière exhaustive et relatent les différentes techniques analytiques mises en œuvre pour la détection des espèces moléculaires de LPS ; (Rietschel *et al.* 1994; Caroff *et al.* 2003). En pratique, la quantification globale de la présence de LPS dans un échantillon est effectuée par une mesure d'activité biologique, exprimée en unité d'endotoxines ((Pharmacopée Européenne 2001) ; cf. Chap.3, § 1.3.10).

Les LPS, présents dans le tractus du fait de la lyse (renouvellement) des bactéries Gram négatif résidentes (cf. Chap.1, § 3.3), sont capables de rejoindre la circulation sanguine par différents moyens. Ils peuvent être absorbés au niveau de la muqueuse intestinale, au moment de l'absorption des lipides. En effet, certaines études ont montré la corrélation entre endotoxémie et lipémie suite à un régime riche en graisses, suggérant que l'absorption des LPS serait favorisée par l'absorption lipidique (Cani *et al.* 2007; Erridge *et al.* 2007) (Ghanim *et al.* 2009; Laugerette *et al.* 2011; Laugerette *et al.* 2012). Le mécanisme de cette co-absorption a été débattu pendant plusieurs années. Ghoshal et ses collaborateurs ont été les premiers à démontrer que la formation de chylomicrons engendre l'absorption de LPS (Ghoshal *et al.* 2009). Ils ont, en effet, mis en évidence que des cellules Caco-2 incubées avec de l'acide oléique (AG stimulant la production de CM) sécrétaient plus de LPS que celles incubées avec de l'acide butyrique (AG à courte chaîne, ne stimulant pas la formation de CM). De plus, l'effet de l'acide oléique sur la sécrétion de LPS est supprimé lors de l'ajout de Pluronic-81 (inhibiteur spécifique de la formation de chylomicrons). Parallèlement, ces auteurs ont gavé des souris invalidées pour le gène des LDL (dont la clairance des chylomicrons est retardée, leur permettant d'avoir une quantité de chylomicrons plus importante) avec des LPS radioactifs puis avec de la trioléine en présence ou non de Pluronic-81 ; une fois de plus, l'absorption des LPS était favorisée par la trioléine et atténuée par

l'inhibiteur. Enfin, les nœuds lymphatiques mésentériques des souris présentaient un taux de radioactivité supérieur suite à l'ingestion de trioléine et réduit en présence de Pluronic-81, démontrant ainsi le transport des LPS au travers des nœuds lymphatiques par des chylomicrons naissants. En outre, les travaux récents de notre équipe ont confirmé, par co-localisation en microscopie électronique, la présence de molécules de LPS sur des chylomicrons humains, obtenus après digestion d'un repas gras (Laugerette *et al.* 2011).

Parallèlement, la théorie d'un passage facilité des LPS par diffusion passive est également avancée. En effet, selon les régimes, la perméabilité intestinale peut varier laissant alors passer plus ou moins de LPS (passage paracellulaire). Lors d'un régime gras chez la souris, l'endotoxémie est associée à une diminution de l'expression des gènes codant pour des protéines de jonction, telles que les occludines (notamment zonula occludens 1, ZO1) (Cani *et al.* 2008).

Enfin, un autre transport alternatif a également été décrit : la translocation bactérienne. Elle réside dans le passage de bactéries viables d'origine digestive à travers la barrière de la muqueuse intestinale vers les ganglions mésentériques et, de là, vers les organes périphériques (Neal *et al.* 2006). Les LPS, portés par ces bactéries, passeraient ainsi la barrière mais ce phénomène de translocation reste généralement observé lors d'« agressions » de la muqueuse intestinale.

Suite à ces phénomènes, la présence de LPS dans la circulation sanguine génère une cascade pro-inflammatoire en cas d'infection, mais également en situation non septique où le niveau d'inflammation reste sub-clinique, comme en cas d'obésité (cf. Chap.1, § 5.2).

CHAPITRE 1 – CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

4. DEVENIR POST-ABSORPTIF DES LIPIDES INGERES : LIPEMIE POSTPRANDIALE ET DISTRIBUTION DES LIPIDES

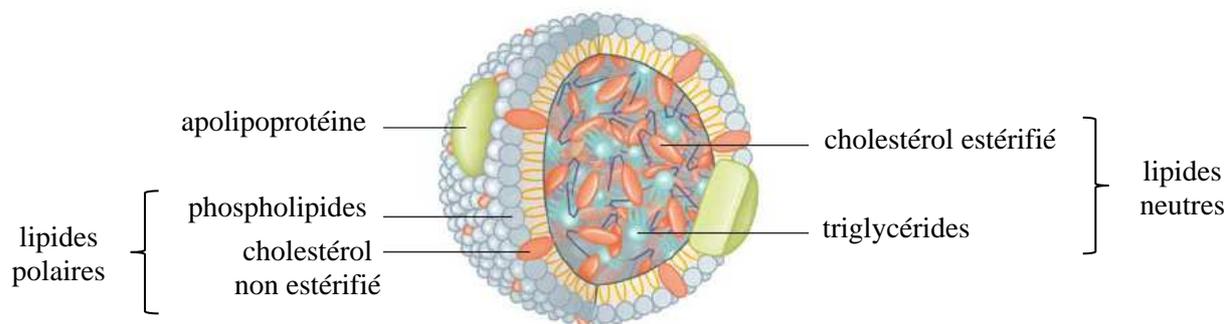


Figure 12. Structure générale d'une lipoprotéine
(adapté d'après Gautier *et al.* 2010)

Tableau 4. Caractéristiques des principales lipoprotéines plasmatiques humaines

Lipoprotéine	Densité (g/mL)	Taille (nm)	Composition (% de la masse totale)					Principales apolipoprotéines
			CL	PL	Apo	TG	CE	
Chylomicron*	0,93	75 - 1200	2	7	2	86	3	B48, C, E
VLDL*	0,93-1,006	30 - 80	7	18	8	55	12	B100, C, E
IDL	1,006-1,019	27 - 35	9	19	19	23	29	B100, C, E
LDL	1,019-1,063	18 - 27	8	22	22	6	42	B100
HDL	1,063-1,125	7 - 12	5	33	40	5	17	AI, AII, C

CE : cholestérol estérifié ; CL : cholestérol libre ; HDL : high density lipoproteins ; IDL : intermediary density lipoproteins ;

LDL : low density lipoproteins ; PL : phospholipides ; TG : triglycérides ; VLDL : very low density lipoproteins

* classé dans les lipoprotéines riches en triglycérides (LRT)

Adapté d'après Dalongeville 2006, Gautier *et al.* 2010

4.1. Lipémie postprandiale et sa modulation nutritionnelle

4.1.1. Lipoprotéines riches en triglycérides

Les lipides, après leur digestion et absorption intestinales, doivent être acheminés jusqu'aux différents tissus périphériques pour leur utilisation. La concentration plasmatique de ces lipides circulants est appelée « lipémie ». Les lipides, hydrophobes, sont véhiculés dans les compartiments extracellulaires aqueux (lympe et sang) au sein de macromolécules complexes, les lipoprotéines. En période postprandiale, les chylomicrons (CM) sont les principales lipoprotéines sécrétées, assurant le transport spécifique des triglycérides alimentaires. On classe les chylomicrons avec les VLDL en tant que lipoprotéines riches en triglycérides (LRT, ou triglyceride-rich lipoproteins TRL, en anglais), contrairement aux autres lipoprotéines, HDL et LDL, pauvres en TG mais riches en cholestérol. Dans le présent manuscrit, seuls les caractéristiques et le métabolisme des LRT seront décrits.

a) *Structure et composition*

Les lipoprotéines comportent un cœur lipidique, constitué de triglycérides et de cholestérol estérifié, recouvert d'une enveloppe amphiphile dont les principaux composants sont les phospholipides, le cholestérol libre et les apolipoprotéines (**figure 12**) (Gautier *et al.* 2010).

On classe généralement les lipoprotéines en fonction de leur taille et de leur densité, mais elles varient également par leur composition lipidique, notamment celle du cœur hydrophobe. Ainsi, les LRT sont les lipoprotéines humaines de plus grande taille, les moins denses et, bien évidemment, les plus riches en triglycérides (**tableau 4**).

Nous devons noter que les remnants de chylomicrons sont également classés parmi les LRT. Il s'agit de particules résiduelles, obtenues après le catabolisme des chylomicrons. Comparés à ces derniers, les remnants sont des particules plus petites, plus denses, relativement plus riches en protéines, cholestérol et phospholipides, mais ayant perdu une large part de triglycérides et d'apolipoprotéines (ApoAI et ApoCII notamment) (Dallongeville 2006; Gautier *et al.* 2010).

Les apolipoprotéines jouent un rôle majeur puisqu'elles confèrent à chaque lipoprotéine ses propriétés fonctionnelles et son devenir métabolique. Par exemple, certaines sont impliquées dans la synthèse et la sécrétion des LRT (ApoB48 pour les CM et ApoB100 pour les VLDL) et d'autres dans l'activation ou l'inhibition d'enzymes impliquées dans leur

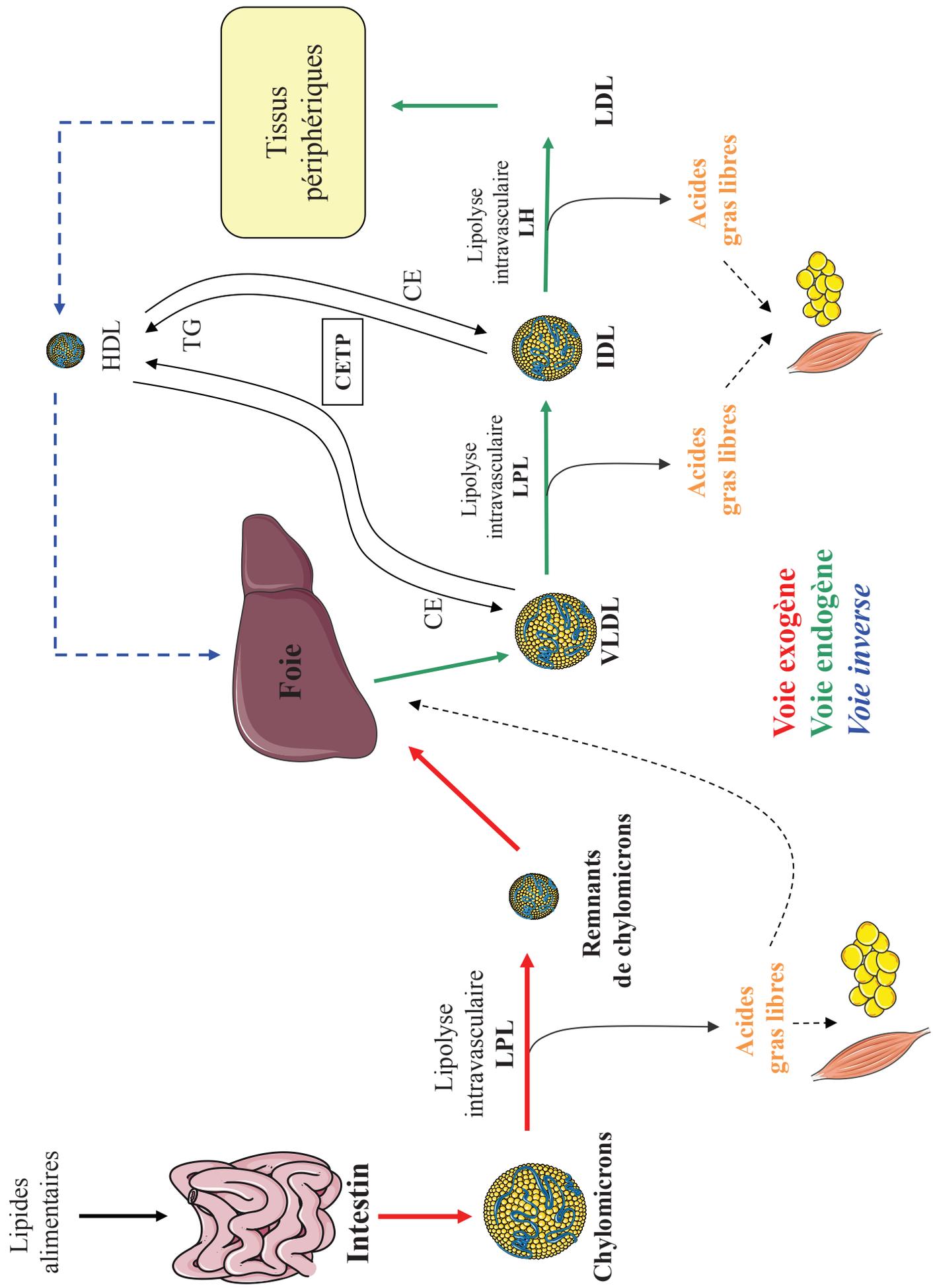


Figure 13. Les différentes voies métaboliques des lipoprotéines humaines

métabolisme intravasculaire (l'ApoCI inhibe la LPL et la lipase hépatique (Brown *et al.* 1972) (Kinnunen *et al.* 1976) ; l'ApoCII active la lipoprotéine lipase (LPL) et l'ApoCIII inhibe la LPL et la captation hépatique des LRT (Jong *et al.* 1999)).

L'apoB48, produite par l'intestin, est spécifique aux chylomicrons (et à leurs remnants) et ne peut s'échanger qu'avec les autres lipoprotéines circulantes (Phillips *et al.* 1997). On compte ainsi une seule molécule d'ApoB48 par chylomicron. L'apoB100, produite par le foie, est exclusivement présente dans les lipoprotéines hépatiques, soit dans les VLDL et ses remnants (IDL et LDL), à hauteur également d'une molécule d'ApoB100 par molécule de lipoprotéine.

La technique d'ultracentrifugation permet de séparer les lipoprotéines plasmatiques selon leur densité (Gofman *et al.* 1949) ; actuellement, elle reste la plus utilisée.

b) Voies métaboliques exogène et endogène

Le métabolisme des LRT comprend deux voies essentielles, dites exogène et endogène, au cœur des échanges entre lipoprotéines et tissus (**figure 13**). En effet, les triglycérides transportés par les chylomicrons sont d'origine exogène (alimentaire) tandis que ceux des VLDL sont d'origine endogène (hépatique). On doit noter l'existence d'une troisième voie (non décrite dans ce manuscrit), nommée voie inverse du cholestérol ou voie de retour, qui concerne le transport du cholestérol depuis les tissus jusqu'au foie, *via* les HDL.

La voie exogène, dite aussi voie entérohépatique, réside dans le transport et la distribution au foie et aux tissus périphériques (muscles, tissus adipeux, cœur) des lipides alimentaires absorbés (**figure 13**). Après leur synthèse et sécrétion (cf. Chap.1, § 3.2.2), les chylomicrons sont métabolisés en deux étapes successives : l'hydrolyse de leur TG par la LPL, suivie du captage des remnants par le foie. La demi-vie des chylomicrons est très courte, 5 minutes en moyenne (Grundy *et al.* 1976), et celle de leurs remnants un peu plus longue (Dalongeville 2006). Les chylomicrons perdent donc très rapidement leur contenu en TG mais aussi en apolipoprotéines mineures (ApoA et ApoC). Celles-ci permettent notamment la naissance de particules HDL, riches en protéines et pauvres en lipides, qui jouent un rôle majeur dans le retour du cholestérol excédentaire des tissus vers le foie (Gautier *et al.* 2010). Une partie des remnants peut être captée par les tissus périphériques tels que le cœur, le muscle squelettique ou le tissu adipeux ; le reste des remnants est catabolisé au niveau du foie, après liaison de l'ApoE à des récepteurs cellulaires spécifiques (Hussain *et al.* 1999).

La voie endogène, dite aussi voie d'apport, est le transport des lipides du foie vers les tissus périphériques ; elle est effectuée par les VLDL, mais aussi par les IDL et LDL issues du catabolisme des VLDL (**figure 13**). Les mécanismes de synthèse et de sécrétion des VLDL, au niveau du foie, sont les mêmes que ceux décrits pour les chylomicrons dans les entérocytes (cf. Chap.1, § 3.2.2). Les hépatocytes élaborent ainsi des particules riches en TG mais dont l'apolipoprotéine de structure principale est l'ApoB100. La synthèse de VLDL est stimulée par le captage hépatique d'acides gras libres, provenant de la digestion d'un repas riche en lipides ou de la lipolyse à jeun du tissu adipeux. Une fois sécrétées, les VLDL circulantes sont rapidement lipolysées par la LPL qui les convertit en IDL (**figure 13**). Ces VLDL et IDL continuent de s'appauvrir en TG mais s'enrichissent en esters de cholestérol grâce à une autre enzyme clé du métabolisme hépatique, la cholesteryl ester transfer protein (CETP). Celle-ci effectue des échanges équimolaires de cholestérol et de TG entre HDL et VLDL/IDL (**figure 13**). Les IDL sont ensuite lipolysées par la lipase hépatique (LH) et transformées ainsi en LDL (produits finaux de cette cascade métabolique). Elles assurent le transport du cholestérol vers les tissus périphériques (Gautier *et al.* 2010). Les lipoprotéines IDL et LDL, de taille réduite et enrichies en cholestérol, peuvent néanmoins être à tout moment réabsorbées par le foie, via des récepteurs cellulaires spécifiques de type LDL-R, selon un mécanisme d'endocytose (Hussain *et al.* 1999). Seuls 50 % des VLDL sont transformés en LDL. La demi-vie des VLDL s'exprime généralement en heures, celle des LDL en jours ; ces données varient sensiblement d'un individu à l'autre compte tenu des nombreux facteurs, autres que la LPL, régulant le métabolisme des VLDL (insuline, apolipoprotéines, ...).

c) Lipolyse intravasculaire et sa régulation

La lipoprotéine lipase est l'enzyme majeure de la lipolyse intravasculaire des LRT. Elle est synthétisée par les cellules parenchymateuses de nombreux tissus, notamment ceux qui sont utilisateurs de lipides, comme le muscle squelettique ou le tissu adipeux. La LPL est ensuite dirigée vers la surface cellulaire puis transloquée au niveau de la face luminale de l'endothélium capillaire, où elle se fixe sur des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG) (Braun *et al.* 1992). La LPL requiert un cofacteur spécifique, l'ApoCII, pour être totalement active (Kinnunen *et al.* 1977). Il est porté à la fois par les chylomicrons et les VLDL. Les LRT circulantes se fixent sur les complexes LPL/HSPG à la surface endothéliale, et la LPL hydrolyse alors les TG en acides gras et en glycérol. Le devenir de ces AG est détaillé au paragraphe 4.2.

L'activité de la LPL est soumise à la régulation de nombreux facteurs : transcriptionnels, traductionnels, protéiques, hormonaux et nutritionnels. Cette régulation, dite « tissu-spécifique », permet un mécanisme local de contrôle de la consommation lipidique et ainsi une distribution appropriée des lipides parmi les tissus.

La LPL est régulée aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel, mais aussi traductionnel et post-traductionnel, par des mécanismes relativement complexes. Ces régulations coordonnent notamment l'expression et l'activité définitives de l'enzyme (Wang *et al.* 2009).

Par ailleurs, de nombreuses protéines interagissent avec la LPL et régulent ainsi son activité. Nous avons vu l'exemple de l'ApoCII qui permet son activation ; à l'inverse, l'ApoCIII inhibe la LPL (Wang *et al.* 1985). Le ratio ApoCII/ApoCIII joue donc un rôle régulateur déterminant, dépendant notamment de l'intestin puisque cet organe est capable de synthétiser ces deux apolipoprotéines (Shachter 2001). La protéine glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) est une molécule des cellules endothéliales, nouvellement ré-identifiée dans le rôle lipolytique de la LPL sur les chylomicrons (Young *et al.* 2007). Sa mutation chez le rongeur et l'Homme serait associée à une hypertriglycémie, même sous un régime pauvre en matière grasse (Beigneux *et al.* 2007; Charriere *et al.* 2011). Cette protéine GPIHBP1 serait le site d'ancrage de la LPL et faciliterait le contact de la LPL avec les LRT circulantes, en pouvant elle-même se lier aux apolipoprotéines (ApoAV notamment) contenues dans les LRT (Beigneux *et al.* 2007; Ory 2007). L'apolipoprotéine AV est donc impliquée dans cette facilitation de contact entre LPL et LRT, et stimulerait ainsi également l'activité de la LPL (Merkel *et al.* 2005). Des mutations de l'ApoAV sont d'ailleurs liées à une hypertriglycémie (Marcais *et al.* 2005). D'autres protéines telles la LMF1 (lipase maturation factor 1) ou la RAP (receptor-associated protein), localisées dans le RE, sont impliquées dans la régulation de la LPL, en influençant notamment sa maturation et donc aboutissant à la formation de LPL inactives (Wang *et al.* 2009). Enfin, les formes 3 et 4 des angiopoietin-like proteins (ANGPTL 3/4) sont reconnues comme des inhibiteurs de la LPL, provoquant une mauvaise clairance des LRT et ainsi une hypertriglycémie (Shimizu-gawa *et al.* 2002; Koster *et al.* 2005).

La régulation de la LPL dépend aussi de nombreux nutriments et hormones, compte tenu de sa tissu-spécificité. Sur le plan hormonal, l'insuline est le modulateur principal de l'activité de la LPL. Celle-ci est en effet activée par l'insuline, dans le tissu adipeux, en période

postprandiale, afin de permettre une clairance rapide et efficace des LRT (Sadur *et al.* 1982). Ce processus d'activation est relativement lent afin de faire coïncider le pic plasmatique des chylomicrons avec l'activité maximale de la LPL (Sadur *et al.* 1982; Bergo *et al.* 1996). En outre, les hormones thyroïdiennes interviendraient également sur l'activité de la LPL, notamment en régulant négativement l'inhibiteur ANGPTL 3 (Saffari *et al.* 1992) ; la plupart des effets relatés ont néanmoins été montrés, pour l'instant, chez le rongeur uniquement (Gavin *et al.* 1985; Fugier *et al.* 2006). En revanche, les hormones sexuelles (œstrogène, testostérone) inhiberaient l'activité de la LPL au niveau du tissu adipeux (participant à la mobilisation des graisses) et l'activeraient au niveau des muscles squelettiques et du cœur (Wang *et al.* 2009).

Sur le plan nutritionnel, les lipides et les glucides peuvent influencer l'activité de l'enzyme lipolytique. Le glucose stimule la LPL *via* un phénomène de glycosylation, essentiel à l'activité catalytique et à la sécrétion de l'enzyme (Kern *et al.* 1987). Il potentialise également l'effet stimulant de l'insuline (Wang *et al.* 2009). Par ailleurs, l'augmentation de la quantité de lipides ingérés entraîne naturellement une augmentation de l'activité de la LPL (Murphy *et al.* 1995). Les lipides agissent également, de manière indirecte, sur la LPL *via* les LRT générées. En effet, l'efficacité de la clairance est inversement proportionnelle au nombre de particules à lipolyser (Martins *et al.* 1996). De plus, les chylomicrons de grosse taille sont plus rapidement hydrolysés que les petits (Xiang *et al.* 1999). Ainsi, les sources de lipides qui engendrent la sécrétion de LRT de plus ou moins grosse taille, ou en plus ou moins grand nombre, ne seront pas lipolysées de la même manière compte tenu de l'influence des LRT générées sur l'activité enzymatique. Enfin, chez des sujets de poids normal, la comparaison des régimes riches en lipides avec ceux riches en glucides a permis de montrer que l'exposition aux glucides induirait une augmentation plus importante de la LPL que celle observée suite à un régime lipidique, et ce, à la fois dans le tissu adipeux sous-cutané et le muscle squelettique (Yost *et al.* 1998). Le statut nutritionnel (à jeun ou nourri) peut également avoir un effet régulateur. En effet, le jeûne régule négativement l'activité de la LPL très rapidement (Olivecrona *et al.* 1995) tandis que l'ingestion d'un repas déclenche progressivement la reprise d'activité de l'enzyme (pic à 4h, Bergo *et al.* 1996). Par ailleurs, l'activité de la LPL au niveau du tissu adipeux augmenterait de manière physiologique au cours de la journée, suite à l'ingestion de plusieurs repas, concourant à un stockage

adipocytaire des lipides ingérés plus important au fur et à mesure de la journée (Ruge *et al.* 2009).

La régulation de la LPL est ainsi très fine et fait intervenir de nombreux acteurs et mécanismes. On comprend alors que toute modification de son activité, ou même de son expression, peut largement contribuer aux désordres métaboliques observés en cas d'hyperlipidémie ou d'obésité.

Parallèlement à l'activité lipolytique de la LPL, d'autres facteurs nutritionnels sont susceptibles de moduler l'intensité et/ou la durée de la lipémie postprandiale. Sont concernés, les lipides, glucides, fibres alimentaires, voire même les protéines et l'alcool. Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux facteurs qui ont trait aux lipides, notamment à leur quantité, leur nature et leur structure, d'après les données disponibles chez les sujets sains.

4.1.2. Effets de la quantité et de la qualité des lipides

Chez l'Homme, des quantités de lipides très faibles (5 g) ou faibles (15 g) n'ont pas d'effet marqué sur la lipémie postprandiale, indiquant que de telles quantités ne dépassent pas la capacité de clairance de l'organisme (Murphy *et al.* 1995; Dubois *et al.* 1998). En revanche, 20 à 30 g de lipides ingérés font augmenter significativement la triglycéridémie postprandiale et, de 30 à 50 g par repas, on observe une relation dose-effet linéaire (Dubois *et al.* 1998; Normand *et al.* 2001). Des doses très élevées (~1 g de matière grasse / kg poids corporel, soit environ 80 g ou plus) ont également été étudiées et montrent une lipémie exacerbée mais aucune relation dose-dépendante (Cohen *et al.* 1988). Ces doses ne sont cependant pas très représentatives car la majorité des repas usuels contient 20 à 40 g de lipides. En revanche, la succession de 3 à 4 repas dans la journée tend à augmenter la lipémie et à la maintenir élevée au cours de la journée et conduit également, dans les pays occidentaux, à une consommation moyenne journalière de 75 g et 100 g de lipides, pour les femmes et les hommes, respectivement (Sanders 2003). En réponse à une charge lipidique modérée (30-50 g), la concentration en triglycérides des chylomicrons (lipémie) suit une courbe en cloche, généralement avec un pic au bout de 2-3 heures et un retour à des valeurs basales au bout de 6 heures en moyenne (Lairon 2008). Des quantités ingérées supérieures, de l'ordre de 1-1,5 g de matière grasse par kg poids corporel, provoquent des périodes postprandiales beaucoup plus longues (8-12h), non physiologiques (Lairon 2008).

Parallèlement, de nombreuses études ont comparé la réponse lipémique en fonction de la nature des lipides apportés par les repas ou les régimes. Il est difficile d'en tirer des conclusions nettes et définitives, les données étant parfois contradictoires selon les études. Les acides gras saturés à chaîne courte ou moyenne induisent des réponses postprandiales faibles car, étant absorbés directement dans la circulation portale, ils ne participent pas à la composition des triglycérides des chylomicrons. On comprend alors que des études utilisant les produits laitiers (notamment le beurre) comme source d'acides gras saturés montrent des résultats de lipémie plus faible que celle engendrée par d'autres types de lipides (saturés longue chaîne ou insaturés) (Mekki *et al.* 2002), puisque la matière grasse laitière se caractérise par une teneur relativement élevée (de l'ordre de 15 %) en acides gras à chaîne courte et moyenne (Jensen 2002); cependant, cette moindre lipémie n'est pas systématiquement retrouvée (Thomsen *et al.* 1999; Svensson *et al.* 2011). D'autres études ont porté sur la comparaison de différentes sources en acides gras à longue chaîne. La plupart s'accordent à montrer que des repas riches en AGS, AGMI et AGPI n'induisent pas des réponses lipémiques très différentes les unes des autres (Mattson *et al.* 1985; Roche *et al.* 1998; Svensson *et al.* 2011). Certains régimes alimentaires peuvent néanmoins influencer la réponse postprandiale suite à un repas. Ainsi, des régimes riches en AGMI (essentiellement acide oléique) et AGPI n-6 (essentiellement acide linoléique) tendent à diminuer la lipémie postprandiale comparés à certains AGS (Roche *et al.* 1998; Jackson *et al.* 2005; Teng *et al.* 2011). Des régimes riches en AGPI n-3 à longue chaîne (EPA, DHA) peuvent diminuer la triglycéridémie postprandiale (Williams *et al.* 1992; Zampelas *et al.* 1994; Rein *et al.* 2009), ce qui n'est pas observé avec des régimes riches en acide α -linoléique (Svensson *et al.* 2011). La diminution de la lipémie engendrée par la consommation d'huiles de poisson (riches en EPA, DHA) serait due à une diminution de sécrétion des LRT et non à l'activité lipolytique de la LPL (Harris *et al.* 1993; Westphal *et al.* 2000). Par ailleurs, des ratios spécifiques AGMI/AGS ou encore AGPI/AGS n'affecteraient pas la triglycéridémie postprandiale (Roche *et al.* 1998; Dekker *et al.* 2009).

Enfin, la lipémie est directement dépendante des caractéristiques des LRT (taille ou contenu en TG) et de leur clairance. On comprend ainsi que selon le type de matières grasses consommées, pouvant induire la sécrétion de chylomicrons plus ou moins gros, en nombre différent, la lipémie postprandiale qui en résulte sera de qualité différente. Il a ainsi été montré que la consommation de beurre provoquait une faible lipémie associée à la sécrétion de petits

chylomicrons, par comparaison à de l'huile d'olive ou de tournesol qui engendraient une lipémie plus élevée et la sécrétion de plus gros chylomicrons (Mekki *et al.* 2002).

Au-delà de la nature des acides gras portés par les triglycérides alimentaires, nous allons voir que certaines différences de lipémie peuvent également s'expliquer, entre autres, par l'arrangement des acides gras sur les molécules de TG.

4.1.3. Impact de la structure des lipides

Comme nous l'avons expliqué aux paragraphes 3.1.2.c et 3.2.4, les structures moléculaires et supramoléculaires des lipides ont un impact sur les étapes de digestion et d'absorption. La lipémie postprandiale qui en résulte est, par conséquent, elle aussi, directement affectée par les différentes structures que peuvent adopter les lipides.

Des études *in vivo*, chez l'animal notamment, montrent que la position interne des AG sur les TG peut avoir des répercussions sur la lipémie postprandiale. Par exemple, chez le rat, un régime de plusieurs mois de saindoux interestérifié (diminution de la proportion du C16:0 en *sn-2*) induit une plus faible lipémie (Renaud *et al.* 1995). D'autres études chez l'animal ont indiqué que si les triglycérides sont manipulés par interestérisation de manière à placer le C18:0 en *sn-2*, la lipémie postprandiale observée est alors plus élevée (Berry *et al.* 2005).

En outre, la clairance des LRT par la LPL dépendrait aussi de la structure moléculaire des TG (Redgrave *et al.* 1988; Mortimer *et al.* 1994) En effet, l'acide stéarique et l'acide palmitique positionnés en *sn-2* diminueraient l'activité lipolytique de la LPL, traduisant une clairance plus ralentie et une lipémie prolongée. Les matières grasses présentant une prédominance d'acides gras saturés en position *sn-2* seraient ainsi mieux absorbées (cf. Chap.1, § 3.2.4) et les LRT, issues de leur digestion, seraient éliminées de la circulation moins rapidement engendrant une lipémie postprandiale plus élevée et plus prolongée, comparé à des matières grasses dont les AG saturés sont en positions externes (*sn-1* et *sn-3*) sur les TG.

Le procédé d'interestérisation a été choisi par l'industrie agroalimentaire afin de produire des ingrédients fonctionnels. C'est le cas du groupe Nabisco qui a développé un substitut lipidique, appelé Salatrim®, utilisé comme ingrédient, dont la composition et la structuration des acides gras ont été façonnées de manière à le rendre peu calorique (5 kcal/g). En effet, le Salatrim® est obtenu par interestérisation d'huiles végétales hydrogénées riches en C18:0 et de TG à très courte chaîne (triacétine, tripropionine et tributyrine). Les TG du Salatrim® contiennent deux AG à chaîne courte et un acide stéarique estérifié aléatoirement sur les 3 positions du glycérol, donc majoritairement (67 %) en position externe (Softly *et al.*

1994). Ainsi, l'acide stéarique étant faiblement absorbé pour les raisons décrites précédemment et les AG courts directement absorbés, la lipémie postprandiale observée est relativement faible (Finley *et al.* 1994; Finley *et al.* 1994; Livesey 2000; Sanders *et al.* 2001).

Il faut noter une fois de plus que, chez l'Homme, l'effet relaté ci-dessus de la position interne des AG sur la lipémie postprandiale n'est pas avéré. En effet, l'incorporation d'acide palmitique dans les TG des chylomicrons est similaire au bout de 6h de digestion, chez des adultes ayant consommé de l'huile de palme native (avec C16 :0 principalement en *sn*-1,3) ou de l'huile de palme interestérifiée (C16 :0 redistribué en *sn*-2) (Yli-Jokipii *et al.* 2003). De plus, la consommation d'huile de palme interestérifiée réduirait même légèrement la lipémie observée (Yli-Jokipii *et al.* 2003). Dans le même sens, la lipémie observée chez des sujets après consommation d'huile de palme native était plus importante comparée à celle d'huile de palme interestérifiée (Berry *et al.* 2007). De nombreux auteurs s'accordent alors à dire que le taux de solide à température corporelle (SFC à 37°C) est un élément bien plus déterminant dans la modulation de la lipémie postprandiale. La part de matière grasse solide à 37°C influencerait davantage l'absorption (cf. Chap.1, § 3.2.4) et la lipémie résultante, en visant à les diminuer, et ce malgré un positionnement privilégié des AG saturés en *sn*-2. En effet, Berry et ses collaborateurs ont montré que la lipémie postprandiale induite par la consommation de beurre de karité natif (riche en TG de type C18:0/C18:1/C18:0) était supérieure à celle observée après consommation de la forme interestérifiée (avec des TG de type C18:0/C18:0/C18:0, C18:0/C18:1/C18:1 et C18:0/C18:1/C18:1) et démontrent en même temps un pourcentage de SFC à 37°C plus élevé de la forme interestérifiée comparé à la forme native du beurre de karité (Berry *et al.* 2007). Enfin, l'équipe de R.P. Mensink a mis en évidence très récemment que les matières grasses solides à température ambiante présentant une forte proportion d'acide palmitique en *sn*-2 induisent une plus faible lipémie postprandiale par comparaison aux huiles liquides (Sanders *et al.* 2011).

Par ailleurs, la structure supramoléculaire des lipides ayant un impact sur leur digestion et leur absorption contribue également à moduler la lipémie postprandiale. En effet, la dispersion des lipides sous la forme de gouttelettes d'émulsion mais aussi la composition de leur interface peuvent affecter la cinétique finale de lipémie postprandiale. Garaiova et ses collaborateurs ont fait consommer à des sujets sains une huile riche en acides gras polyinsaturés, pré-émulsionnée ou non ; les cinétiques de lipémie obtenues pour les deux formes ingérées sont très différentes et montrent, au bout de 9 heures, une absorption plus importante des acides gras polyinsaturés lorsqu'ils ont été préalablement émulsionnés

Tableau 5. Récapitulatif de l'impact des structures moléculaire et supramoléculaire des lipides sur la lipémie postprandiale

Lipémie postprandiale	
Structure moléculaire	
Position <i>sn</i> -1, 2, 3 sur TG	Peu affectée voire diminuée malgré AG saturés en <i>sn</i> -2
Structure supramoléculaire	
Propriétés thermiques / SFC	↘ si SFC élevé
Emulsions	↗ si lipides émulsionnés (vs non émulsionnés)
- Taille des gouttelettes	Peu influencée par une diminution de taille
- Nature du surfactant	✓ + élevée avec phospholipides à l'interface qu'avec des caséines + monoglycérides
	✓ Augmentée plus rapidement avec des phospholipides à l'interface qu'avec un émulsifiant anionique (SSL)
AG : acide gras ; SFC : solid fat content ; SSL : sodium stearoyl lactylate ; TG : triglycéride	

(Garaiova *et al.* 2007). Cette étude clinique confirme les résultats de précédents travaux effectués chez l'animal, montrant que l'émulsification est de nature à modifier la cinétique de lipémie, et notamment l'apparition du pic de TG (Michalski *et al.* 2005; Michalski *et al.* 2006; Laugerette *et al.* 2011). En revanche, une fois les lipides émulsionnés, la taille des gouttelettes d'émulsion (~1 vs ~10 µm) n'affecte pas fortement la cinétique d'assimilation lipidique (Armand *et al.* 1999). Enfin, une étude menée récemment sur la nature des émulsifiants indique que des émulsions stabilisées par des caséines et des monoglycérides induisent une lipémie postprandiale plus faible, comparées à celles stabilisées avec des phospholipides (lécithine d'œuf) (Keogh *et al.* 2011). L'équipe de M. Golding a également mis en évidence que des émulsions stabilisées par des phospholipides ou du sodium stearoyl lactylate (SSL, émulsifiant anionique) n'induisent pas la même lipémie, notamment en raison de l'impact du surfactant sur la stabilité des émulsions en conditions gastrique et duodénale (Golding *et al.* 2011).

Les différents facteurs, détaillés ci-dessus, impactant sur la lipémie postprandiale sont résumés dans le **tableau 5** ci-contre.

4.1.4. *Autres facteurs nutritionnels*

D'autres facteurs nutritionnels sont susceptibles de faire varier la lipémie. Le cholestérol alimentaire augmente sensiblement la triglycéridémie (en favorisant l'accumulation des chylomicrons) lorsqu'il est consommé en quantité vraiment importante (Dubois *et al.* 1994) ; la consommation de quantités modérées ou la consommation chronique d'un régime riche en cholestérol n'induit cependant pas de changements notables de la lipémie postprandiale (Dubois *et al.* 1994; Ginsberg *et al.* 1994).

La nature et la quantité de glucides peuvent altérer le métabolisme lipidique en période postprandiale. Si l'addition de glucose à un repas lipidique chez des individus sains ne montre pas de résultats cohérents quant à la variation de la lipémie postprandiale (Cohen *et al.* 1990), le saccharose, et plus encore le fructose, induisent des augmentations très marquées de la triglycéridémie (Jeppesen *et al.* 1995). Des aliments riches en amidon tels que le pain blanc, les pâtes ou encore les haricots ne modifient pas notablement la réponse lipémique globale bien que l'hyper-insulinémie associée augmente l'accumulation postprandiale des chylomicrons dans le plasma de sujets sains (Harbis *et al.* 2001). En revanche, l'ingestion d'un repas à fort index glycémique exacerbe la lipémie postprandiale de sujets obèses

insulino-résistants, chez qui une augmentation à la fois des chylomicrons et des VLDL a été observée (Harbis *et al.* 2004) ; la résistance périphérique à l'insuline provoque, en effet, une diminution de la dégradation des LRT par la LPL couplée à une augmentation de la sécrétion des VLDL par le foie.

Peu de données existent quant aux effets de la quantité et de la nature des protéines. L'ajout de caséines engendrerait une diminution modérée (20%) de la lipémie postprandiale (Westphal *et al.* 2004). Récemment, Mortensen et ses collaborateurs ont montré, chez des patients diabétiques de type 2, l'effet bénéfique de l'ajout de protéines sériques à un repas gras sur la réponse lipémique des sujets ; comparés à des caséines, du gluten ou à des protéines de cabillaud, les protéines sériques (lait) permettent une nette amélioration de la lipémie des diabétiques, probablement *via* la formation de moins de chylomicrons ou *via* une clairance augmentée de ces particules (Mortensen *et al.* 2009).

L'addition de certaines fibres alimentaires, comme le son d'avoine, à des repas mixtes diminue nettement les chylomicrons générés et ainsi la triglycéridémie postprandiale (Lairon *et al.* 2007). La diminution de la concentration en chylomicrons est due à la capacité de ces fibres à perturber les étapes d'hydrolyse et de micellisation des lipides dans l'intestin. D'autres sources de fibres, comme le son de blé, n'ont pas ce type d'effet métabolique (Lairon *et al.* 2007).

On doit noter qu'en dehors du plan nutritionnel, l'activité physique, l'âge ou encore le sexe sont également des facteurs reconnus pour moduler la lipémie (Tsetsonis *et al.* 1996; Couillard *et al.* 1999; Jackson *et al.* 2003).

4.2. Répartition postprandiale des lipides alimentaires

4.2.1. Distribution des lipides : oxydation vs stockage

Une fois la lipolyse des LRT effectuée par la LPL, les acides gras générés servent de substrat aux différents tissus périphériques. Ces derniers utilisent les acides gras pour en extraire de l'énergie (sous forme d'ATP) ou pour en faire une réserve lipidique (sous forme de TG préférentiellement). Le tissu adipeux blanc est ainsi reconnu comme lieu de stockage privilégié des graisses tandis que les muscles, le cœur ou les reins utilisent les AG à des fins énergétiques en les β -oxydant. Comment les acides gras, en particulier exogènes, sont-ils

orientés vers des voies de stockage plutôt que d'oxydation ? Quels facteurs, nutritionnels ou métaboliques, contribuent-ils à cette répartition des lipides ?

Tout d'abord, il faut rappeler certaines disparités existantes entre les trois catégories de nutriments (glucides, lipides et protéines). Ils contribuent, en effet, à la couverture énergétique de manière hiérarchisée et chronologique : glucides, protéines puis lipides. Cette priorité d'oxydation est classée selon un ordre inverse à la capacité de l'organisme à stocker ces macronutriments. En effet, leur compartiment de réserves énergétiques a une capacité nulle pour les protéines, limitée pour les glucides et immense pour les lipides, ce qui représente déjà une première facilité d'orientation du métabolisme lipidique (vers le stockage). Par ailleurs, au niveau local, nos cellules disposent de moyens de stimulation à moyen et long termes de l'oxydation lipidique comme de l'oxydation glucidique. En revanche, à court terme, elles ont des moyens efficaces de stimuler l'oxydation glucidique, d'inhiber celle des lipides (et donc les orienter vers le stockage), mais pas de moyens efficaces de stimuler l'oxydation lipidique. Ces mécanismes de régulation au niveau cellulaire se manifestent également à l'échelle du corps entier et sont aussi influencés par les apports nutritionnels ponctuels (glucides vs lipides) et le type d'alimentation (plus riche en lipides ou en glucides). Plusieurs équipes ont cherché à savoir comment un apport lipidique exogène se répartissait entre oxydation et stockage et s'il modifiait le devenir métabolique des lipides endogènes. Chez des sujets sains normo-pondérés, une faible augmentation de l'oxydation lipidique associée à une balance lipidique positive (c'est-à-dire, apports lipidiques > oxydation lipidique) ont été rapportées lors de charges orales/alimentaires ponctuelles plus ou moins importantes en lipides (Binnert *et al.* 1996) (Sonko *et al.* 2001). En situation plus physiologique, avec un repas mixte, Flatt et ses collaborateurs ont montré un défaut de stimulation en aigu de l'oxydation lipidique par l'apport alimentaire de lipides et une orientation préférentielle du métabolisme de ces lipides vers le stockage (Flatt *et al.* 1985). Les différences de régulation avec les glucides observées au niveau cellulaire, en aigu, sont ainsi retrouvées au niveau de l'organisme, dont la capacité à stimuler rapidement l'oxydation lipidique en réponse à un apport en lipides semble très limitée. Cependant, à plus long terme, l'oxydation lipidique s'adapte à une alimentation hyperlipidique et d'après le modèle de Flatt, chez des sujets ayant pris du poids (obèses), l'oxydation lipidique serait augmentée (Flatt *et al.* 1985). Il faudrait alors considérer la réponse métabolique à un apport lipidique chez l'obèse : la réponse du métabolisme lipidique chez ces sujets serait différente selon qu'elle fait suite à apport lipidique ponctuel ou à un apport adapté aux besoins énergétiques des personnes (Binnert *et al.* 1998; Marrades *et al.*

2007). Récemment, l'équipe de K. Frayn a également rapporté une oxydation des acides gras exogènes plus importante chez des sujets obèses par rapport à des sujets normo-pondérés, en l'attribuant à un phénomène compensatoire et adaptatif de répartition des acides gras afin de prévenir l'accumulation de lipides dans le foie (Hodson *et al.* 2010).

Ainsi, la lipogenèse étant négligeable chez l'homme sain et notre organisme ayant une capacité réduite à augmenter l'oxydation lipidique en réponse à une alimentation riche en graisses, toute surconsommation de lipides favorise leur stockage dans le tissu adipeux. Nous avons vu que la masse grasse de l'organisme dépend de l'équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques (cf. Chap.1, § 1.2.1) mais elle est donc également dépendante de l'orientation des lipides vers la β -oxydation ou le stockage. L'obésité représente alors la conséquence ultime d'une perturbation de la répartition des graisses alimentaires entre oxydation et stockage. De fait, de nombreuses données montrent que l'obésité s'accompagne d'anomalies de l'utilisation des graisses comme substrat énergétique (Schutz *et al.* 1989). Une moindre oxydation lipidique associée à une altération de la capacité du muscle à oxyder les AGNE a également été rapportée en situation postprandiale chez des sujets obèses ou avec des antécédents familiaux d'obésité (Kalant *et al.* 2000; Giacco *et al.* 2004). De plus, l'oxydation des graisses alimentaires après une charge orale en lipides (TG avec AGLC) est diminuée de 50% chez le sujet obèse (Binnert *et al.* 1998). De façon intéressante, chez les sujets de poids normal, une partie importante des lipides alimentaires est retrouvée au niveau des AGNE, alors que cette réponse est diminuée chez les sujets obèses, suggérant une captation plus importante des graisses par le tissu adipeux chez ces derniers (Binnert *et al.* 1998). Dans cette étude de C. Binnert, le défaut de stimulation de l'oxydation lipidique par un apport ponctuel en lipides est donc retrouvé chez les obèses, avec une tendance à un stockage plus important chez ces sujets. De même, chez les rats non obèses, les graisses alimentaires sont orientées préférentiellement vers le muscle pour y être oxydées, alors que chez les rats obèses Zucker, les lipides alimentaires sont essentiellement dirigés vers le tissu adipeux (Bessesen *et al.* 1995). Enfin, en réponse à une alimentation hyperlipidique prolongée, chez l'obèse, les études réalisées concluent à une capacité d'adaptation diminuée, favorisant à long terme le stockage des lipides et donc le développement d'une surcharge de masse grasse (Thomas *et al.* 1992).

Compte tenu de ces données convaincantes quant à un déséquilibre du devenir métabolique des lipides chez l'obèse, la recherche de certains leviers pour moduler ou corriger ce déséquilibre est toujours d'actualité. En premier lieu, la longueur de chaîne des

acides gras semble modifier leur β -oxydation. En effet, l'oxydation semble défectueuse en situation d'obésité, mais cela est généralement le cas en présence d'acides gras à chaîne longue car, avec des acides gras à chaîne moyenne, l'oxydation lipidique est restaurée chez l'obèse, à un niveau équivalent de celui observé pour des sujets contrôles normo-pondérés (Binnert *et al.* 1998). De plus, les acides gras insaturés seraient mieux beta-oxydés que les acides gras saturés à chaîne longue (Couet *et al.* 1997; Piers *et al.* 2002; Soares *et al.* 2004).

L'ensemble de ces données indiquent que la capacité à augmenter l'oxydation lipidique en réponse à un apport lipidique est généralement réduite et que l'obésité est associée à un défaut de l'oxydation lipidique (en particulier, musculaire) ainsi qu'à une distribution des lipides alimentaires favorisant leur stockage. La modulation par la qualité et la structure des acides gras semble être une piste pertinente pour remédier au déséquilibre de la balance de répartition des graisses observé chez les obèses. Néanmoins, à l'heure actuelle, un moyen sûr et efficace sur le long terme de faire pencher la balance vers l'oxydation reste une diminution des apports alimentaires associée à un niveau raisonnable d'activité physique (Achten *et al.* 2004; Bergouignan *et al.* 2009).

4.2.2. Phénomène de « spillover »

La source principale d'acides gras circulants est la lipolyse du tissu adipeux par la lipase hormono-sensible (LHS) (Coppack *et al.* 1994). Néanmoins, il apparaît que la lipolyse effectuée par les lipases endothéliales, notamment par la LPL, contribue sensiblement au pool plasmatique d'acides gras (Miles *et al.* 2004), à hauteur de 5-35% des acides gras du pool plasmatique après un repas (Lambert *et al.* 2012). En effet, si les acides gras générés par la lipolyse intravasculaire (LPL) sont généralement utilisés rapidement par les tissus, il a été observé qu'une partie d'entre eux peut ne pas être captée et reste ainsi dans la circulation systémique. Ce « débordement » ou « fuite » d'acides gras est appelé « spillover ». Les LRT (cibles de la LPL) sont donc directement impliqués dans ce phénomène et en représentent une source majeure.

Comme indiqué précédemment, les VLDL et les chylomicrons sont tous deux riches en TG et subissent l'action de la LPL. La contribution des VLDL au spillover est mineure, si l'on considère notamment le faible taux de renouvellement de ces particules (Miles *et al.* 2004; Gormsen *et al.* 2006). En revanche, les chylomicrons peuvent représenter une source majeure, surtout suite à la digestion d'un repas riche en lipides. Le spillover, dû aux chylomicrons, et

observé en postprandial (4,5-5,5 h après un repas mixte), serait en moyenne de 25% chez des sujets sains et de 18% chez des patients obèses diabétiques (Miles *et al.* 2007). Cependant, il faut noter que ce phénomène de spillover peut être très variable et peut dépendre de plusieurs facteurs. Il varie, en effet, selon le temps de digestion écoulé (Evans *et al.* 2002), le statut métabolique des individus (normal, obésité, diabète ; Miles *et al.* 2007; Ruge *et al.* 2009), la succession des repas (Ruge *et al.* 2009) et le type de tissu (muscle *vs* tissu adipeux ; (Miles *et al.* 2004; Nelson *et al.* 2007; Ruge *et al.* 2009)). Ainsi, l'ensemble de ces études montrent que le spillover serait (i) augmenté en période postprandiale, et ce d'autant plus en fin de journée après des repas successifs (Evans *et al.* 2002 ; Ruge *et al.* 2009), (ii) plus important au niveau du tissu adipeux que du muscle squelettique (Miles *et al.* 2004; Nelson *et al.* 2007) et, (iii) plus faible chez des personnes présentant des désordres métaboliques (diabète, obésité), comparé à des sujets sains (Miles *et al.* 2007).

De nombreuses recherches sont ainsi menées sur ce phénomène de spillover des acides gras alimentaires. Les facteurs régulant la quantité d'acides gras qui entrent dans la circulation sanguine *via* la voie du spillover n'ont cependant pas encore été identifiés clairement. Il reste également à savoir si ce spillover d'acides gras est un indicateur d'événements bénéfiques ou néfastes en période postprandiale. Le spillover peut traduire une activité démesurée de la LPL, plus rapide que le captage tissulaire. Un tel spillover, plus important, signifie-t-il un captage plus faible des muscles et du tissu adipeux, exposant ainsi d'autres organes comme le foie ou le cœur à de fortes concentrations en acides gras non estérifiés ? L'hypothèse de la participation du spillover à la formation de dépôts ectopiques est de plus en plus étayée. Les acides gras, pouvant être stockés de manière excessive dans des tissus non prévus à cet effet, seraient alors capable d'interagir avec la voie de signalisation de l'insuline et conduiraient à la mise en place de l'insulino-résistance (Unger *et al.* 2000; Krebs *et al.* 2005). On peut également se demander si les individus ayant un fort spillover après un repas présentent une forte activité lipolytique de la LPL et une meilleure clairance des acides gras par les tissus. Le spillover est diminué après une perte de poids, ce qui peut prévenir des dépôts ectopiques lipidiques dans d'autres tissus tels que le foie ou le cœur. Néanmoins, il peut aussi stimuler la reprise de poids en favorisant le captage adipocytaire des acides gras (Faraj *et al.* 2001). Des études sont actuellement en cours afin de déterminer le rôle des muscles et du foie dans la clairance de ces acides gras.

CHAPITRE 1 – CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

5. ENDOTOXEMIE ET INFLAMMATION ASSOCIEES COMME NOUVEAUX FACTEURS DE RISQUE METABOLIQUE LIES A LA PHASE POSTPRANDIALE

5.1. Composante inflammatoire du risque métabolique

L'inflammation se traduit par la mise en place d'un ensemble de mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. Les cellules qui interviennent dans les mécanismes de l'inflammation sont à la fois des cellules circulantes (monocytes, lymphocytes, et autres cellules polynucléaires) qui migrent vers les tissus interstitiels et des cellules résidentes des tissus interstitiels (macrophages, mastocytes, cellules endothéliales, fibroblastes). Sous l'influence de stimuli variés et notamment de composés bactériens comme les LPS (cf. Chap.1, § 3.3.3), ces cellules sont alors capables de synthétiser et de libérer toutes sortes de médiateurs qui vont directement agir auprès d'autres types cellulaires en les activant. Parmi les médiateurs jouant un rôle majeur dans la réaction inflammatoire, les cytokines sont connues pour être d'efficaces médiateurs intercellulaires, en réagissant avec des récepteurs membranaires spécifiques présents à la surface des cellules cibles. Une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et agir sur un nombre important de cibles différentes. Dans le cas des cellules immunitaires, la synthèse de cytokines est généralement induite par l'activation de voies de signalisation intracellulaires, et notamment l'activation de facteurs de transcription, tels que nuclear factor-kappa B (NF- κ B). Parmi les cytokines pro-inflammatoires les plus couramment étudiées, on retrouve l'interleukine-6 (IL-6), le tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), la C-reactive protein (CRP) ou encore plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (Blackwell *et al.* 1996).

Ces dernières années, les phénomènes inflammatoires sont au cœur de nombreuses recherches car leur implication dans le développement des désordres métaboliques associés à l'obésité (diabète de type 2, insulino-résistance, athérosclérose...) est désormais bien établie (Ding *et al.* 2011; Laugerette *et al.* 2011). Cependant, l'origine exacte des processus inflammatoires impliqués reste méconnue. Nous allons revenir sur deux phénomènes inflammatoires, reliés en situation métabolique altérée : l'inflammation chronique, dite « à bas bruit », observée notamment en cas d'obésité, et l'inflammation transitoire décrite en période postprandiale.

5.1.1. Obésité et inflammation à bas bruit

La situation d'obésité se caractérise par un état inflammatoire chronique, couramment appelé « inflammation à bas bruit » ou « inflammation de bas grade ». En effet, les mesures à

jeun des concentrations plasmatiques ou des expressions géniques tissulaires de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- α ou encore la CRP chez des sujets obèses indiquent des niveaux anormalement élevés (Dandona *et al.* 1998) (Bastard *et al.* 1999) (Bistrrian *et al.* 2000; Laimer *et al.* 2002) et l'analyse des monocytes circulants de ces personnes révèle une augmentation de la transcription de nombreux gènes pro-inflammatoires régulés par NF- κ B (Ghanim *et al.* 2004), traduisant ainsi un état inflammatoire généralisé. De plus, plusieurs études ont mis en avant une corrélation directe entre les concentrations plasmatiques d'IL-6 à jeun et l'obésité des sujets étudiés (Vozarova *et al.* 2001; Kershaw *et al.* 2004). L'expression d'IL-6 du tissu adipeux serait en fait dix fois plus importante chez les individus obèses, par rapport aux individus normo-pondérés (Fried *et al.* 1998), et ce malgré la normalisation par le nombre d'adipocytes présents. Cela s'expliquerait par le fait que 90 % de l'expression d'IL-6 du tissu adipeux provient des cellules non-adipocytaires (fraction du stroma vasculaire). En effet, il est important de rappeler que le stroma vasculaire est responsable de la majorité des sécrétions du tissu adipeux (Fain *et al.* 2006), dont la sécrétion de cytokines, et ce d'autant plus en raison du nombre important de macrophages infiltrés dans le tissu d'obèses (Weisberg *et al.* 2003; Xu *et al.* 2003). Le tissu adipeux des individus obèses demeure donc un déterminant majeur des concentrations circulantes d'IL-6, contribuant jusqu'à 30% de la production totale de cette cytokine (Mohamed-Ali *et al.* 1997). De plus, il est bien établi que le TNF- α est surexprimé dans le tissu adipeux d'obèses (Hotamisligil *et al.* 1994; Kern *et al.* 1995). Enfin, la production hépatique de CRP étant sous le contrôle des cytokines IL-6 et TNF- α (Castell *et al.* 1990) et le tissu adipeux sécrétant également de la CRP, il a été montré que les individus obèses présentaient des concentrations plasmatiques élevées de CRP comparativement à des sujets d'IMC normal (Visser *et al.* 1999). Ainsi, le tissu adipeux est le principal responsable de l'expression de ces médiateurs inflammatoires mais ce sont principalement les macrophages, infiltrés dans le tissu, qui contribuent à moduler l'activité sécrétoire des adipocytes. La production locale de cytokines, *via* le recrutement de macrophages, participe grandement à la mise en place d'une insulino-résistance dans le tissu, qui s'étend ensuite à l'organisme entier provoquant de manière systémique une perte de sensibilité à l'insuline et une inflammation chronique (Gutierrez *et al.* 2009).

5.1.2. Régimes hyperlipidiques et inflammation postprandiale

La possible contribution à cette inflammation chronique de phénomènes inflammatoires transitoires en phase postprandiale a récemment été soulevée. La consommation de repas

Tableau 6. Effet de la composition des repas tests relatés dans la littérature, visant à étudier l'effet des repas hyperlipidiques sur l'inflammation postprandiale

Référence	Repas test hyperlipidique	Réponse inflammatoire observée
	Energie (E) & macronutriments	Aliments
Nappo <i>et al.</i> (2002)	Total E : 760 kcal ; 58 g glucides (28,5 %E), 50 g de lipides (dont 20,4 g saturés) (59,2 %E), quantité de protéines non indiquée (12,3 %E)	2 saucisses (80 g), 6 tranches de pain (90 g), 1 œuf (40 g), du beurre (15 g) et de l'huile d'olive (5 g)
Blackburn <i>et al.</i> (2006)	Total E : de 1800 à 2200 kcal (selon surface corporelle) ; 60 g lipides/m ² surface corporelle (64% E), glucides (18 %E), protéines (18 %E)	Œufs, fromage, pain, beurre de cacahuètes, pêches, crème fouettée et lait
Poppitt <i>et al.</i> (2008)	Total E : ~ 750 kcal ; lipides (71 %E), glucides (23 %E), protéines (5 %E)	~ 60 g de beurre dont le ratio AGS/AGI a été modifié : ratio élevé (71/29) vs ratio faible (55/45)
Bellido <i>et al.</i> (2004)	Total E : 50-66 % de la prise énergétique quotidienne des sujets étudiés ; repas avec 60 % lipides à hauteur de 1 g lipides / kg poids corporel, 15 % protéines et 25 % glucides	Suite à un régime de type occidental (Western diet) de 4 semaines, test de digestion à base d'huile d'olive, beurre ou noix
Aljada <i>et al.</i> (2004)	Total E : 910 kcal ; 81 g glucides, 51 g de lipides, 32 g de protéines	1 sandwich aux œufs + 1 sandwich à la saucisse + 2 galettes de pommes de terre

AGS : acides gras saturés ; AGI : acides gras insaturés.

contenant au moins 50 g de lipides s'accompagnerait en effet d'une modification des marqueurs plasmatiques circulants (cytokines notamment) durant les heures suivant le repas (inflammation postprandiale) (**tableau 6**). En effet, Nappo et ses collaborateurs ont montré qu'un repas contenant 50 g de lipides était capable d'induire les cytokines IL-6 et TNF- α , contrairement à un repas riche en glucides de type pizza, chez des sujets en léger surpoids, sains ou diabétiques (Nappo *et al.* 2002). De plus, l'équipe canadienne de Charles Couillard a également mis en avant, chez des sujets en surpoids, une augmentation plasmatique d'IL-6 suite à un repas mixte, très riche en MG (60 g MG/m² surface corporelle), s'accompagnant cependant d'une diminution transitoire de TNF- α (Blackburn *et al.* 2006). Une augmentation significative postprandiale d'IL-6 a également été observée chez des adultes sains dans les heures suivant la prise d'un petit-déjeuner riche en lipides (~ 60 g de beurre dont ratios saturés/insaturés modifiés) (Poppitt *et al.* 2008). La consommation de beurre ou de noix suite à un régime de type occidental (Bellido *et al.* 2004) ou d'un repas mixte contenant 50 g de lipides (Aljada *et al.* 2004) a également été reportée chez des sujets sains comme augmentant l'activation postprandiale du facteur de transcription NF- κ B des monocytes périphériques. Chez des patients atteints de maladies coronariennes, un repas gras (65 g de lipides, dont mayonnaise à base d'huile de soja) induit également une augmentation postprandiale d'IL-6 (Lundman *et al.* 2007). Cependant, d'autres données publiées sont contradictoires et ne démontrent pas les mêmes variations des paramètres inflammatoires. Les travaux de Manning et ses collaborateurs mettent en avant une diminution transitoire des niveaux plasmatiques d'IL-6 et de TNF- α au cours des heures suivant un repas mixte, soit à base de crème lactière soit à base d'huile d'olive à hauteur de 0,6 g/kg, chez des sujets diabétiques en surpoids (Manning *et al.* 2004). Par ailleurs, une étude a récemment mis en évidence que la consommation d'un petit-déjeuner à base de beurre (suite à un régime à l'occidentale de 4 semaines) induisait une augmentation transitoire de l'expression de TNF- α et d'IL-6 (mais non de MCP-1) des cellules immunitaires circulantes, par comparaison à un petit-déjeuner à base de noix (précédé d'un régime riche en oméga 3) ou à base d'huile d'olive (précédé d'un régime de type méditerranéen) (Jimenez-Gomez *et al.* 2009); il faut noter cependant qu'aucun effet a été observé sur les taux plasmatiques postprandiaux des cytokines IL-6, TNF- α et MCP-1, suite aux trois petits-déjeuners testés. De plus, il a été reporté chez des jeunes femmes que la consommation de beurre de cacao ou d'huile d'olive, à hauteur de 1 g de MG/kg (soit 62 g en moyenne), n'affectait pas les marqueurs postprandiaux pro-inflammatoires, IL-6 et CRP ultrasensible (Tholstrup *et al.* 2011). La même équipe a

Tableau 6 (suite). Effet de la composition des repas tests relatés dans la littérature, visant à étudier l'effet des repas hyperlipidiques sur l'inflammation postprandiale

Référence	Repas test hyperlipidique	Réponse inflammatoire observée
	Energie (E) & macronutriments	Aliments
Lundman <i>et al.</i> (2007)	Total E : 1000 kcal ; ~ 65 g lipides (60 % E), glucides (27 %E), protéines (13 %E)	Pâtes, blanc de poulet bouilli, petits pois mayonnaise (à base d'huile de soja)
Manning <i>et al.</i> (2004)	<i>Non indiqué</i>	Purée de pommes de terre, 2 œufs + huile d'olive ou crème lactière (0,6 g / kg)
Jimenez-Gomez <i>et al.</i> (2009)	Pour chacun des 3 petits-déjeuners : 1 g lipides / kg poids corporel avec lipides (60% E), glucides (25 % E), protéines (15% E)	Petit-déjeuner à base de beurre (35 % AGS) avec pain complet, œuf dur, lait entier. Petit déjeuner à base d'huile olive (36% d'AGMI) avec pain, tomates, lait écrémé et œuf dur. Petit-déjeuner à base de noix (16 % AGPI, 4 % ALA), avec pain complet, confiture et lait écrémé.
Tholstrup <i>et al.</i> (2011)	Total E : en moyenne 621 kcal ; 1 g lipides / kg poids corporel soit en moyenne 62 g lipides (76 % E), glucides (21 %E), protéines (3 %E)	MG donnée avec purée de pommes de terre à hauteur de 1 g de MG/ kg, 1 g purée/ kg et 3mL d'eau bouillante / g poudre de purée
Teng <i>et al.</i> (2011)	Total E : 683 kcal ; 50 g lipides (60 % E), glucides (33 %E), protéines (7 %E)	60 g de purée de pommes de terre, 180 g d'haricots blancs à la sauce tomate, 50 mL de lait écrémé, 200 mL de jus d'orange et 50 g de MG test (huile d'olive, oléine de palme ou saindoux)

AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; ALA : acide α -linoléique ; MG : matière grasse.

également montré l'absence d'augmentation postprandiale des cytokines IL-6, IL-1 β et TNF- α suite à la consommation de 50 g de lipides apportés soit par de l'oléine de palme, soit par de l'huile d'olive ou du saindoux, chez des hommes sains normo-pondérés (Teng *et al.* 2011). Il semblerait donc que l'apport exogène de lipides n'ait pas un effet systématique sur les marqueurs de l'inflammation en période postprandiale, même si nous verrons que la qualité (profil en AG) des matières grasses testées peut avoir un impact sur la réponse inflammatoire observée (cf. § 5.1.3 suivant). L'impact de la composition nutritionnelle des repas hyperlipidiques (testés dans les études relatées ci-dessus) sur l'inflammation postprandiale est synthétisé dans le **tableau 6**.

Dans le cas où des effets pro-inflammatoires sont observés, l'apport d'une charge importante en lipides peut représenter un stress et engendrer une altération des fonctions endothéliales, entraînant alors la réponse inflammatoire transitoire observée. Ceci est certainement le cas dans les études citées précédemment pour lesquelles des charges très élevées de lipides ingérés (≥ 50 g), peu réalistes, ont été étudiées (Nappo *et al.* 2002; Blackburn *et al.* 2006; Poppitt *et al.* 2008; Bellido *et al.* 2004; Aljada *et al.* 2004; Lundman *et al.* 2007). De plus, des données récentes suggèrent le rôle du récepteur TLR4 dans les phénomènes inflammatoires postprandiaux associés à l'ingestion de lipides. TLR4 est impliqué dans l'initiation de cascades pro-inflammatoires lorsqu'il est en présence de LPS (cf. Chap.1, § 5.2.2) ; plusieurs études proposent les lipides, et notamment les AG saturés, comme ligands potentiels pour ce même récepteur, pouvant ainsi provoquer une réponse inflammatoire et à terme une insulino-résistance (Kim *et al.* 2007; Schaeffler *et al.* 2009; Youssef-Elabd *et al.* 2012). Cependant, Clett Erridge et Nilesh Samani contestent vivement le lien direct entre lipides, TLR4 et inflammation, en expliquant que l'activation du TLR4 par les AG saturés serait un artéfact expérimental dû à une contamination par des LPS des solutions d'acides gras préparées et testées (Erridge *et al.* 2009). Par ailleurs, chez des sujets métaboliquement sains, l'effet anti-inflammatoire de l'augmentation d'insuline (Dandona *et al.* 2001) et de la diminution des AGNE (Tripathy *et al.* 2003), telles qu'observées en période postprandiale, ne sont également pas négligeables et contribuent très probablement à l'absence ou à la diminution des réponses inflammatoires, telles que relatées précédemment (Manning *et al.* 2004). En revanche, on comprend qu'en situation d'obésité et/ou d'insulino-résistance, ces actions anti-inflammatoires de l'insuline et des AGNE doivent être altérées. Ainsi, la charge orale en lipides semble jouer un rôle plus ou moins avéré mais ne suffit pas à elle seule à expliquer certains phénomènes inflammatoires observés, comme en situation

d'obésité. L'état métabolique des sujets serait ainsi un autre facteur clé dans la réponse inflammatoire ; celle-ci serait fortement influencée par l'état de surcharge pondérale (Alvarez *et al.* 2009) et les désordres métaboliques associés, et notamment par le statut d'insulino-résistance des sujets (Blackburn *et al.* 2006). Chez des individus obèses, l'inflammation chronique observée serait à même d'augmenter la quantité de cytokines sécrétées en postprandial (Manning *et al.* 2008).

Si les lipides sont montrés du doigt compte tenu de leur potentielle implication dans l'inflammation postprandiale, il faut néanmoins rappeler que tous les acides gras ne sont pas égaux face à leurs effets métaboliques et certains sont décrits comme pouvant moduler l'inflammation.

5.1.3. Effets modulateurs des lipides alimentaires sur l'inflammation métabolique

Il est désormais bien connu que les acides gras polyinsaturés des familles n-3 et n-6 ont des effets différents au regard de l'inflammation. Les omégas 3 présentent des effets bénéfiques pour la santé avec des propriétés anti-inflammatoires, à l'inverse des omégas 6, s'ils sont consommés en excès (DeFilippis *et al.* 2006). Il est donc recommandé que le rapport AG n-6/AG n-3 soit de l'ordre de 1 à 5, et non supérieur à 10 comme il l'est dans l'alimentation occidentale actuelle (diminution de la consommation de poissons gras riches en n-3 et augmentation de celle de produits transformés riches en n-6, (Simopoulos 2002). Plus précisément, les AGPI n-3 et n-6 peuvent être convertis par voie enzymatique en de nombreux composés dérivés (thromboxanes, leucotriènes, prostaglandines), regroupés sous le nom des eicosanoïdes et docosanoïdes. Ces dérivés des AGPI n-3 (ALA, DHA, EPA) sont environ 100 fois moins actifs sur le processus inflammatoire que ceux dérivés de l'acide arachidonique (AA, n-6) (DeFilippis *et al.* 2006). Compte tenu de la compétition enzymatique entre n-3 et n-6 pour leur métabolisation, une augmentation de l'apport en AG n-3 s'accompagne ainsi d'un effet anti-inflammatoire en inhibant compétitivement la génération des eicosanoïdes inflammatoires produits à partir de l'AA. Par ailleurs, les AGPI n-3, en particulier les longues chaînes, inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6), effet qui n'est pas retrouvé avec les AGPI n-6 (Meydani *et al.* 1993). De nombreuses études ont ainsi mis en évidence la corrélation entre la consommation régulière d'AGPI n-3 et une diminution des marqueurs de l'inflammation systémique (Pischon *et al.* 2003; Rallidis *et al.* 2003; Lopez-Garcia *et al.* 2004).

Les acides gras saturés à longue chaîne seraient, quant à eux, associés plus particulièrement à un effet pro-inflammatoire aigu (phase postprandiale) ou chronique lors d'un régime hyperlipidique. En effet, dans l'étude de Nappo et ses collaborateurs, citée précédemment, la charge lipidique provoquant une augmentation très significative d'IL-6 et de TNF- s'avérait riche en AG saturés (Nappo *et al.* 2002). Chez le rat, l'ingestion chronique d'un régime gras, riche en AG saturés, est associé à un phénomène pro-inflammatoire généralisé dans différents tissus (tissu adipeux, foie et muscle squelettique) (Borst *et al.* 2005). D'autres études menées sur cultures de cellules endothéliales ou d'adipocytes montrent que la nature des lipides joue un rôle dans la réaction inflammatoire, avec un effet marqué de certains AG saturés. L'acide palmitique est alors souvent comparé à l'acide oléique. Le palmitate active (i) des voies pro-inflammatoires dans les cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) contrairement à l'oléate (Ciapaite *et al.* 2007) et (ii) l'expression d'IL-6 dans des macrophages et des cellules musculaires en culture contrairement aux AG insaturés (Weigert *et al.* 2004; Jove *et al.* 2006). Le palmitate augmente également l'expression de NF- κ B, d'IL-6 et du TNF- α dans des cellules adipocytaires 3T3-L1 en culture, cet effet n'étant pas observé avec les AG insaturés que sont l'oléate et le DHA (Ajuwon *et al.* 2005). Il faut alors noter que le palmitate est très souvent utilisé comme AG saturé mais son effet ne doit pas être extrapolé à tous les acides gras saturés. En effet, la matière grasse laitière ou l'huile de palme, toutes deux riches en AG saturés, peuvent ne pas présenter les mêmes effets inflammatoires. Notre équipe a ainsi montré, chez la souris, qu'un régime riche en huile de palme induisait une augmentation significative d'IL-6 plasmatique au bout de 8 semaines et que cet effet n'était pas observé après un régime à base de matière grasse laitière (Laugerette *et al.* 2012). De plus, la consommation de produits laitiers, ayant la connotation d'être à base d'une MG animale riche en AGS, s'avère en fait reliée à un état inflammatoire diminué, comme le démontrent plusieurs études. Par exemple, chez des souris nourries avec un régime à base de lait, l'expression des marqueurs de l'inflammation tels que TNF- α , IL-6 ou MCP1 du tissu adipeux a été retrouvée diminuée (Zemel *et al.* 2008). Chez l'Homme, des sujets en surpoids ayant suivi un régime riche en produits laitiers (lait, yaourt, fromage) présentent des taux de CRP significativement diminués (Zemel *et al.* 2008) et une étude transversale, menée en Grèce sur 3000 hommes et femmes, a récemment mis en évidence une corrélation inverse entre les marqueurs de l'inflammation CRP, IL-6 et TNF- α et la consommation de produits laitiers, de manière dose-dépendante (Panagiotakos *et al.* 2010). Enfin, les AG saturés sont souvent comparés aux AG insaturés mais, en aigu, les différences de réponse inflammatoire

selon la qualité des AG testés ne sont parfois pas convaincantes. Reprenons l'exemple de quelques études citées plus haut (Manning *et al.* 2004; Tholstrup *et al.* 2011; Teng *et al.* 2011). Les équipes de P.J. Manning et T. Tholstrup n'ont pas relevé d'augmentation des marqueurs plasmatiques de l'inflammation suite à la consommation de quantités élevées de lipides (> 50 g), et ce malgré des matières grasses aux compositions en AG différentes (huile d'olive vs crème lactière, beurre de cacao ou oléine de palme). Une étude très récente remet aussi en cause l'effet de la qualité des AG insaturés en montrant qu'augmenter la quantité d'AGPI n-3 de charges orales riches en AG saturés n'induit pas de changement de réponse inflammatoire chez des hommes présentant un syndrome métabolique (Tulk *et al.* 2009).

Ainsi, l'induction des marqueurs de l'inflammation en phase postprandiale suite à la consommation d'un repas gras déséquilibré semble être impactée par la nature des acides gras, certains ayant des effets pro-inflammatoires plus marqués que d'autres. De plus, au vu de la littérature relatée précédemment, le tissu adipeux joue un rôle central dans l'établissement de l'inflammation à bas bruit observée chez les obèses et la consommation chronique de repas riches en lipides doit participer aux phénomènes inflammatoires observés, d'autant plus si les lipides consommées sont à caractère « pro-inflammatoire ». Toutefois, nous devons nous intéresser à l'émergence de nouvelles études mettant aussi en avant l'implication du microbiote intestinal dans les phénomènes inflammatoires observés et démontrant son importance vis-à-vis du risque métabolique encouru. A composition identique de la matière grasse ingérée, des composés du microbiote plus ou moins absorbés pourraient-ils générer une inflammation postprandiale différente ?

5.2. Nouvelle composante inflammatoire associée au microbiote : l'endotoxémie

5.2.1. Altérations du microbiote et maladies métaboliques

Chaque être humain est unique au regard de son microbiote résident, même si des similitudes entre microbiotes peuvent apparaître aux niveaux des genres et phylas bactériens (cf. Chap.1, § 3.3.1). En effet, deux phylas principaux, *Bacteroidetes* et *Firmicutes*, caractérisent le microbiote humain mais leur ratio peut changer selon l'âge (Mariat *et al.* 2009) ou l'état métabolique des individus (Kelsen *et al.* 2012). Une étude préliminaire, chez la souris, a mis en avant une réduction de 50% des *Bacteroidetes* et une augmentation proportionnelle des *Firmicutes* chez des souris obèses comparativement à des souris sauvages

minces, suggérant des microbiotes différents (Ley *et al.* 2005). Chez l'Homme, l'équilibre entre les populations bactériennes serait également différent entre les microbiotes d'individus obèses et minces. Cependant, à l'heure actuelle, les résultats sont assez controversés : l'équipe de Jeffrey I. Gordon a montré une diminution importante des *Bacteroidetes* dans le microbiote d'hommes obèses comparé à des normo-pondérés (Ley *et al.* 2006) tandis que Zhang et ses collaborateurs ont reporté une plus grande quantité de *Bacteroidetes* chez des individus obèses (Zhang *et al.* 2009) et d'autres n'ont pas observé de telles différences entre les phylas selon l'IMC des sujets étudiés (Duncan *et al.* 2008). Enfin, une équipe française a récemment mis en évidence (i) une diminution significative du sous-groupe *Bacteroides/Prevotella* chez des obèses morbides par comparaison à des sujets normo-pondérés et, (ii) une moindre diversité des espèces bactériennes chez leurs individus obèses (Furet *et al.* 2010). Malgré l'hétérogénéité des résultats, il en ressort que la composition du microbiote s'avère modifiée en situation d'obésité et cette altération bactérienne participerait aux désordres métaboliques observés. Le microbiote serait en réalité un facteur clé dans la physiopathologie de l'obésité, contribuant à son développement comme en témoignent les données expérimentales obtenues chez l'animal. Tout d'abord, le transfert du microbiote de souris conventionnelles à des souris axéniques (dépourvu de microbiote) conduit à une augmentation de leur masse grasse de près de 60 % dans les deux semaines suivant l'inoculation (Bäckhed *et al.* 2004). De plus, des souris conventionnelles accumulent davantage de poids suite à un régime à l'occidentale dit « Western diet » (plus riche en graisses et en sucres), comparées à des souris axéniques soumises au même régime (Bäckhed *et al.* 2007). Enfin, la colonisation de souris axéniques avec le microbiote de souris obèses induit une augmentation significative de prise de poids chez ces souris, comparativement à celles ayant été colonisées par un microbiote de souris minces (Turnbaugh *et al.* 2006). Pour expliquer ces observations, les auteurs ont proposé et étayé plusieurs idées : (i) la prise de poids serait favorisée par l'angiogenèse intestinale induite par le microbiote, (ii) le microbiote de souris obèses apparaît plus efficace que celui de souris minces dans la récupération d'énergie à partir des résidus alimentaires et (iii) le microbiote réduirait le facteur adipeux appelé fasting-induced adipose factor (Fiaf, aussi connu sous le nom de angiopoietin-like 4 ou ANGPTL4), un inhibiteur circulant de la LPL, et augmenterait ainsi l'activité lipolytique puis le stockage des acides gras générés (Bäckhed *et al.* 2007). Par ailleurs, chez l'Homme, les autres maladies métaboliques telles que le diabète de type 2 ou la maladie de Crohn (maladie inflammatoire chronique intestinale ou MICI) se caractérisent également par une altération du microbiote intestinal. Il a été reporté

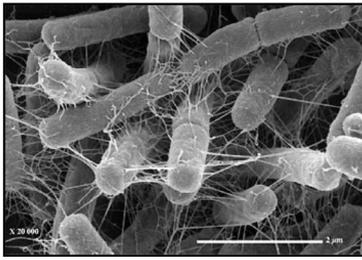
une diminution significative du phylum des *Firmicutes* chez des patients diabétiques de type 2 (Larsen *et al.* 2010), retrouvée également chez des patients atteints de MICI où la perte d'une sous-population de *Firmicutes* apparaît être liée à la pathologie (Sokol *et al.* 2006) (Sokol *et al.* 2009). En outre, des modifications du microbiote intestinal ont été observées chez des individus obèses suite à une phase dynamique de perte de poids, par le biais d'un régime alimentaire (Ley *et al.* 2006) ou d'une chirurgie bariatrique de type by-pass gastrique (Furet *et al.* 2010), montrant notamment une augmentation progressive de bactéries appartenant au phylum des *Bacteroidetes* au fur et à mesure du régime alimentaire et des mois suivant la chirurgie bariatrique. Il faut toutefois noter que si Duncan et ses collaborateurs ont relevé, chez des obèses modérés, des modifications des espèces bactériennes suite à une perte de poids *via* un régime alimentaire, ils n'ont pour autant pas observé de changements quant aux *Bacteroidetes* du microbiote des individus étudiés suite au régime (Duncan *et al.* 2008). Enfin, de manière intéressante mais restant à vérifier chez l'Homme, l'équipe de R. Burcelin a montré très récemment que des souris soumises à un régime gras (huile de maïs et saindoux, < 1% de glucides) pendant 3 mois, devenant ainsi diabétiques, développent un microbiote particulier, différent de celui de souris soumises au même régime mais qui se montrent résistantes au diabète (Serino *et al.* 2012).

Le lien entre maladies métaboliques et microbiote apparaît ainsi de plus en plus avéré, avec des résultats probants chez l'animal, étayés par des études observationnelles chez l'Homme. L'implication du microbiote intestinal dans la physiopathologie de l'obésité a également été démontrée suite à la mise en évidence de sa capacité à produire des molécules pro-inflammatoires, les endotoxines ou LPS, qui participent activement au développement de l'inflammation à bas bruit associée à l'obésité *via* l'endotoxémie métabolique.

5.2.2. Transport plasmatique d'endotoxines bactériennes et cascade inflammatoire

Nous avons vu que les LPS, notamment ceux du microbiote, étaient capables de rejoindre la circulation sanguine par différentes voies (cf. Chap.1, § 3.3.3) ; il est ensuite bien connu que leur transport plasmatique peut être assuré par différents types de transporteurs, pouvant alors engendrer une cascade pro-inflammatoire.

Les LPS véhiculés par les chylomicrons en phase postprandiale seraient libérés lors de l'hydrolyse de ces derniers par la LPL puis très rapidement captés par la lipopolysaccharide binding protein (LBP). Cette glycolipoprotéine, principalement produite par le foie, se lie avec une forte affinité aux LPS par le biais de leur lipide A (Tobias *et al.* 1989) et assure ainsi



Bactéries Gram négatif
(type *E.coli*)

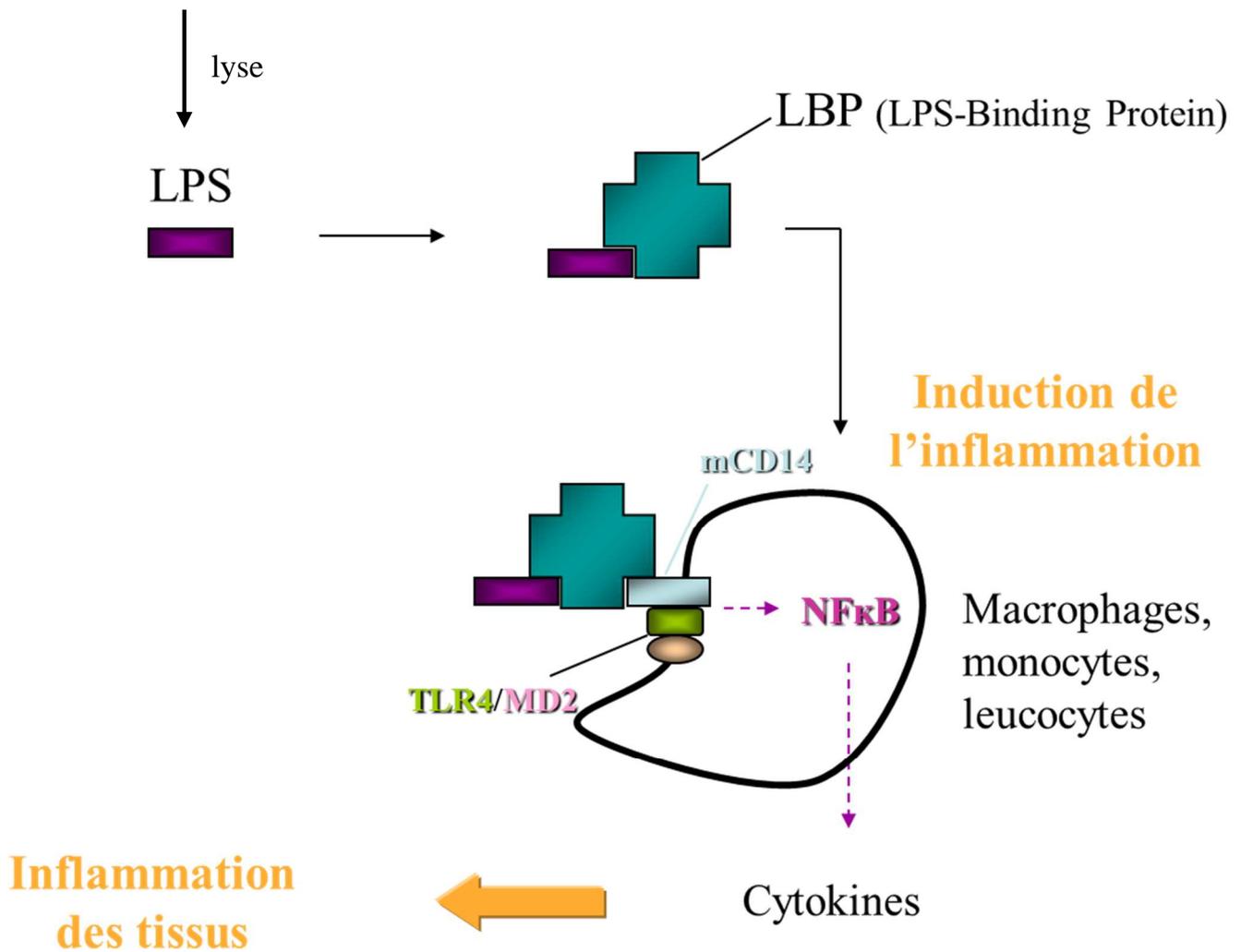


Figure 14. Cascade pro-inflammatoire induite par les lipopolysaccharides (LPS)

majoritairement leur transport dans la circulation sanguine. Les lipoprotéines véhiculent également les LPS vers le foie où ils sont éliminés par les cellules de Kupffer (macrophages résidents du foie) (Toth *et al.* 1992). Toutes les classes de lipoprotéines sont susceptibles de séquestrer des LPS (Levels *et al.* 2001) ; la liaison LPS-lipoprotéines dépendrait du nombre de phospholipides en surface des lipoprotéines (Manco *et al.* 2010). Des échanges sont alors possibles entre particules circulantes puisque les phospholipides sont capables de lier la LBP qui délivre alors les LPS qu'elle transporte aux lipoprotéines (Manco *et al.* 2010). Dans les conditions physiologiques normales, les HDL sont les principaux accepteurs de LPS (Kitchens *et al.* 2003) et contribuent ainsi à leur détoxification. En cas d'inflammation aiguë, la LBP semble délivrer les LPS préférentiellement aux LDL, compte tenu de la réduction plasmatique des HDL (Kitchens *et al.* 2003; Levels *et al.* 2005). De tels mécanismes d'échange de LPS entre LBP et HDL/LDL participent activement à l'épuration hépatique des toxines de l'organisme, notamment en cas de choc septique, où de grandes quantités de LBP inhibent ainsi l'activité des LPS (Lamping *et al.* 1998) (Zweigner *et al.* 2001). Les chylomicrons pourraient également participer à cette détoxification, en diminuant la toxicité des LPS *via* leur interaction avec la LBP (Vreugdenhil *et al.* 2003).

En revanche, en cas d'état métabolique ordinaire ou en situation d'obésité où le niveau d'inflammation reste sub-clinique (non septique), de faibles quantités de LBP sont connues pour augmenter l'activité pro-inflammatoire des LPS (Lamping *et al.* 1998). En effet, les LPS bactériens induisent une réaction inflammatoire plus importante quand ils sont liés à la LBP (Mathison *et al.* 1992; Tobias *et al.* 1992) et se révèlent être de puissants inducteurs de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Marshall 2005) (**figure 14**). Concrètement, les LPS circulants sont transportés par la LBP jusqu'aux cellules du système immunitaire inné (macrophages) et les activent *via* un complexe trimoléculaire composé du cluster of differentiation 14 (CD14), du toll-like receptor 4 (TLR4) et de la myeloid differentiation protein-2 (MD2). Le CD14 sert de récepteur au complexe LPS/LBP et permet de le transférer vers TLR4 et MD2, engendrant ainsi une activation des voies de signalisation intracellulaires. Celles-ci provoquent alors la transcription de gènes, tel que Nuclear Factor- κ B (NF- κ B), aboutissant à la synthèse de cytokines, telles que IL-6 et IL-1 β , par les cellules immunitaires.

Le CD14 existe sous deux formes distinctes et complémentaires. La forme membranaire (mCD14) est généralement exprimée et synthétisée pour répondre à la présence éventuelle de LPS tandis que la forme soluble (sCD14) le serait lors d'un afflux important et inhabituel de LPS. Plus précisément, la forme soluble sCD14 serait produite soit par clivage de la forme

membranaire soit sécrétée directement par certains types cellulaires (cellules endothéliales notamment), et ce afin d'activer des cellules ne présentant pas de mCD14 (Tomlinson *et al.* 2004; Marcos *et al.* 2010). La prise en charge des LPS par la forme sCD14 est reportée comme ayant des effets inhibant l'activité des LPS en les conduisant vers des voies de détoxification par les HDL (Wurfel *et al.* 1994; Sussman 2002).

Si ces mécanismes de transport et de résultante inflammatoire des LPS sont décrits depuis longtemps dans le cadre de l'étiologie du sepsis, l'implication de l'endotoxémie plasmatique dans l'inflammation métabolique, l'obésité et le diabète reste une découverte très récente.

5.2.3. Régimes hyperlipidiques, obésité et endotoxémie métabolique

Différents travaux menés ces dernières années chez la souris par Patrice Cani et ses collaborateurs démontrent pour la première fois que le microbiote est une source potentielle d'endotoxines capables de générer une inflammation et d'être augmentées suite à un repas gras. En effet, ils ont tout d'abord montré qu'un repas gras augmente la concentration plasmatique en LPS et qu'un régime hyperlipidique de plusieurs semaines la maintient élevée (Cani *et al.* 2007). Cette augmentation des concentrations plasmatiques en endotoxines a alors été nommée « endotoxémie métabolique » par opposition à l'endotoxémie classique, quant à elle associée à un choc septique et donc à des concentrations en endotoxines bien plus élevées. Cette endotoxémie métabolique a été étroitement corrélée avec des modifications de la composition du microbiote intestinal, à savoir une corrélation négative entre le nombre de Bifidobactéries et l'endotoxémie, lors du régime hyperlipidique. Cani et ses collaborateurs ont également mis en évidence, dans la même étude, que la perfusion chronique de LPS, à des concentrations similaires à l'endotoxémie métabolique, induit une prise de poids chez l'animal nourri d'un régime normo-lipidique et que des souris invalidées pour le récepteur mCD14 se montrent résistantes à la prise de poids induite par un régime hyperlipidique, démontrant ainsi le lien entre endotoxémie et métabolisme de la prise de poids. Par ailleurs, d'autres données suggèrent un rôle non négligeable de la qualité du microbiote intestinal sur les variations de l'endotoxémie métabolique et donc indirectement sur le déclenchement des altérations associées. En effet, les mêmes auteurs ont montré que l'apport de fibres alimentaires, augmentant significativement la quantité de Bifidobactéries (Gram positif) dans le tractus intestinal, permettait de normaliser le ratio bactéries Gram négatif/bactéries Gram positif ainsi que l'endotoxémie métabolique (Cani *et al.* 2007). Enfin, une modification sélective du microbiote intestinal de souris obèses et diabétiques, au moyen d'antibiotiques,

Tableau 7. Effet de la composition des repas tests relatés dans la littérature, visant à étudier l'effet des repas hyperlipidiques sur l'endotoxémie postprandiale

Référence	Repas test hyperlipidique	Endotoxémie observée
	Energie (E) & macronutriments	Aliments
Erridge <i>et al.</i> (2007)	Total E : ~900 kcal	1 tasse de thé, 3 tranches de pain beurrées avec 50 g de beurre au total
Laugerette <i>et al.</i> (2009)	Total E : 291 kcal ; 33 g lipides	200 mL Fortimel® (émulsion entérale), 23 g de margarine, 9,4 g de beurre, 1 g d'huile d'olive, 85 g de pain, 20 g de confiture et 200 g de banane
Ghanim <i>et al.</i> (2009)	Total E : 910 kcal ; 51 g lipides (dont 33 % saturés), 88 g glucides, 34 g protéines	Sandwiches aux œufs et à la sauce et deux galettes de pommes de terre
Ghanim <i>et al.</i> (2010)	900 kcal (51 g lipides, 81 g glucides, 32 g protéines) + 75 g glucose (300 kcal) ou jus d'orange ou eau	Sandwiches aux œufs et à la sauce et deux galettes de pommes de terre + boisson sucrée ou jus d'orange ou eau

permet de réduire l'endotoxémie métabolique ainsi que l'inflammation à bas bruit associée (Cani *et al.* 2008). Du point de vue de l'importance des lipides alimentaires dans ces phénomènes, notre équipe a montré, chez la souris, une modulation de l'endotoxémie métabolique par la qualité (profil en acides gras) de l'huile constituant le régime gras (Laugerette *et al.* 2012) ainsi qu'une augmentation de l'endotoxémie postprandiale par l'émulsification préalable d'huile de tournesol (avec de la lécithine), donnée aux animaux par gavage (Laugerette *et al.* 2011).

A l'heure actuelle, des données cliniques chez l'Homme viennent compléter ces résultats chez l'animal. En effet, des études récentes ont établi que l'endotoxémie plasmatique était plus élevée chez des sujets diabétiques de type 2 obèses (Creely *et al.* 2007) et chez des patients souffrant de maladies inflammatoires intestinales (Pastor Rojo *et al.* 2007) que chez des sujets sains. En outre, une endotoxémie plasmatique plus élevée a été associée à une prise alimentaire plus importante, et corrélée notamment à une plus forte consommation de matières grasses, chez des sujets sains mais à risques métabolique et cardiovasculaire (Amar *et al.* 2008). Plus récemment, l'activité des endotoxines a été reportée fortement corrélée aux différents composants du syndrome métabolique (Lassenius *et al.* 2011). Par ailleurs, Clett Erridge et ses collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence une augmentation de l'endotoxémie postprandiale après un repas gras (50 g de beurre tartiné) chez des fumeurs occasionnels minces ou obèses (Erridge *et al.* 2007). Nous avons aussi observé, chez l'Homme, une augmentation transitoire de l'endotoxémie postprandiale, lors de la digestion d'un repas complexe contenant 33 g de lipides de diverses compositions et structures dans le repas (Laugerette *et al.* 2009). De plus, l'équipe de Paresh Dandona a démontré, *via* plusieurs études chez des hommes sains et minces, une augmentation des LPS plasmatiques en période postprandiale suite à l'ingestion de repas riches en graisses, avec ou sans glucides (Ghanim *et al.* 2009; Deopurkar *et al.* 2010; Ghanim *et al.* 2010). Rappelons que les chylomicrons, au cours de leur sécrétion, contribueraient à cette absorption d'endotoxines (cf. Chap.1, § 3.3.3). Enfin, des études très récentes confirment également ces résultats d'endotoxémie postprandiale chez des diabétiques de type 2 (Harte *et al.* 2012) et des obèses morbides (Clemente-Postigo *et al.* 2012), suite à la consommation d'un repas riche en lipides. L'impact de la composition nutritionnelle des repas hyperlipidiques (testés dans les études chez l'Homme relatées ci-dessus) sur l'endotoxémie postprandiale est synthétisé dans le **tableau 7**.

Les endotoxines plasmatiques, dont la présence a ainsi été corrélée à de nombreuses situations pathologiques, peuvent participer activement aux complications métaboliques, et ce

Tableau 7 (suite). Effet de la composition des repas tests relatés dans la littérature, visant à étudier l'effet des repas hyperlipidiques sur l'endotoxémie postprandiale

Référence	Energie (E) & macronutriments	Repas test hyperlipidique	Aliments	Endotoxémie observée
Deopurkar <i>et al.</i> (2010)	Total E : 300 calories	75 g de glucose ou 75 g de crème laitière (70 % AGS, 28 % AGI) ou même quantité isocalorique de jus d'orange ou 300 mL d'eau		Augmentation de l'endotoxémie postprandiale de 45 ± 17 % (par rapport au basal) au bout de 3 h suite à la crème (et endotoxémie continue d'augmenter jusqu'à 5h) ; aucun effet suite au glucose, à l'eau ou au jus d'orange
Harte <i>et al.</i> (2012)	Total E : ~ 700 kcal ; 75 g lipides, 5 g glucides, 6 g protéines		Crème fraîche liquide	Augmentation de l'endotoxémie postprandiale au bout de 4 heures
Clemente-Postigo <i>et al.</i> (2012)	50 g lipides, dont 10 g saturés, 30 g monoinsaturés et 10 g polyinsaturés		Charge orale en lipides (100 mL)	Taux circulants d'endotoxines augmentés au bout de 3 heures, dans le plasma et les chylomicrons

AGI : acides gras insaturés ; AGS : acides gras saturés

en raison de leur prise en charge spécifique dans le plasma. En effet, une fois les LPS présents dans le plasma par les différentes voies décrites en 3.3.3, leur transport par la LBP ou le sCD14 conduit à des effets métaboliques différents (cf. Chap.1, § 5.2.2). Les LPS circulants *via* la LBP sont capables d'induire des réactions pro-inflammatoires par l'intermédiaire de mCD14/TLR4 tandis que la forme sCD14 est reconnue pour faciliter la détoxification. On comprend alors l'importance de ces transporteurs/récepteurs et de leurs proportions respectives, au regard de l'effet métabolique engendré. Le ratio LBP/sCD14 est notamment augmenté lors d'une réponse inflammatoire aiguë (Stoll *et al.* 2004) et s'avère plus élevé chez des patients souffrant de MICI (Crohn) comparé à des sujets témoins (Lakatos *et al.* 2011). Du point de vue d'une modulation par les lipides alimentaire, notre équipe a également montré chez la souris que l'augmentation plasmatique d'IL-6 était associée à une augmentation du ratio LBP/sCD14, suite à un régime hyperlipidique à base d'huile de palme (Laugerette *et al.* 2012). Ainsi, ces transporteurs s'avèrent être de bons marqueurs de l'exposition aux endotoxines et de leur potentiel de résultante pro-inflammatoire, d'autant plus que leur demi-vie est plus longue (24 à 48 h) que celle des endotoxines elles-mêmes (de quelques minutes à 3 heures maximum chez l'Homme, (Matsushita *et al.* 2010)). Les transporteurs et récepteurs semblent ainsi mieux refléter l'exposition à long terme aux endotoxines comparé au dosage des endotoxines, plus fiable pour mesurer des cinétiques transitoires de l'absorption d'endotoxines. On peut ainsi constater, dans la littérature, l'émergence des études qui montrent l'importance de ces transporteurs, mettant en avant la LBP comme marqueur pertinent de phénomènes inflammatoires (van Dielen *et al.* 2001), cardiovasculaires (Lepper *et al.* 2011), d'insulino-résistance et d'obésité (Sun *et al.* 2010; Moreno-Navarrete *et al.* 2011) et proposant le sCD14 comme nouvelle piste thérapeutique contre l'inflammation initiée par l'obésité et l'insulino-résistance (Fernandez-Real *et al.* 2011).

CHAPITRE 2 – HYPOTHESES ET OBJECTIFS

Notre revue de la littérature met en avant que la structuration des lipides alimentaires peut servir de levier pour moduler la cinétique d'absorption intestinale des lipides et la cinétique de lipémie postprandiale, notamment par la structure émulsionnée. Toutefois, l'impact d'une telle modulation d'absorption sur le devenir métabolique postprandial des lipides reste à élucider et les spécificités des sujets obèses par rapport aux normo-pondérés dans ce contexte n'ont encore jamais été décrites. De plus, la réponse postprandiale à différentes quantités de matière grasse chez l'obèse n'a encore jamais été étudiée de manière exhaustive et reste peu caractérisée. Par ailleurs, certains travaux de la littérature montrent que la présence de lipides dans un repas induit une endotoxémie postprandiale transitoire, liée en partie aux chylomicrons, pouvant contribuer au risque métabolique déjà encouru en raison d'une lipémie élevée. Cependant, la modulation de ce phénomène *via* une modification de la lipémie par différentes quantités et structures de matière grasse chez l'homme normo-pondéré ou obèse n'est pas connue.

Nous émettons donc les hypothèses que la matière grasse ingérée affecterait différemment, selon son état émulsionné ou non dans le repas et selon sa quantité, (i) la cinétique de sécrétion des chylomicrons et (ii) l'absorption associée d'endotoxines bactériennes. Ceci contribuerait à moduler l'orientation (i) des lipides alimentaires vers la β -oxydation ou le stockage et (ii) des endotoxines vers des voies pro-inflammatoires ou de détoxification, par le biais de leurs transporteurs plasmatiques. Nous supposons également que l'ensemble de ces phénomènes pourraient différer selon l'IMC des sujets étudiés, et notamment être aggravés chez l'obèse. Enfin, en situation d'absorption intestinale fortement diminuée, comme dans le cas d'un by-pass gastrique, nous pensons qu'un tel court-circuit de l'intestin permettrait de prévenir les effets de l'absorption des endotoxines et de contribuer ainsi à rétablir une insulino-sensibilité.

Nos objectifs ont donc été les suivants (**figure 15**, ci-après):

- Evaluer, chez l'Homme, les effets de la quantité et de la structure de la matière grasse ingérée sur le métabolisme postprandial des lipides incluant la lipémie et le devenir bêta-oxydatif des lipides (totaux et exogènes), chez des sujets d'IMC différents ;

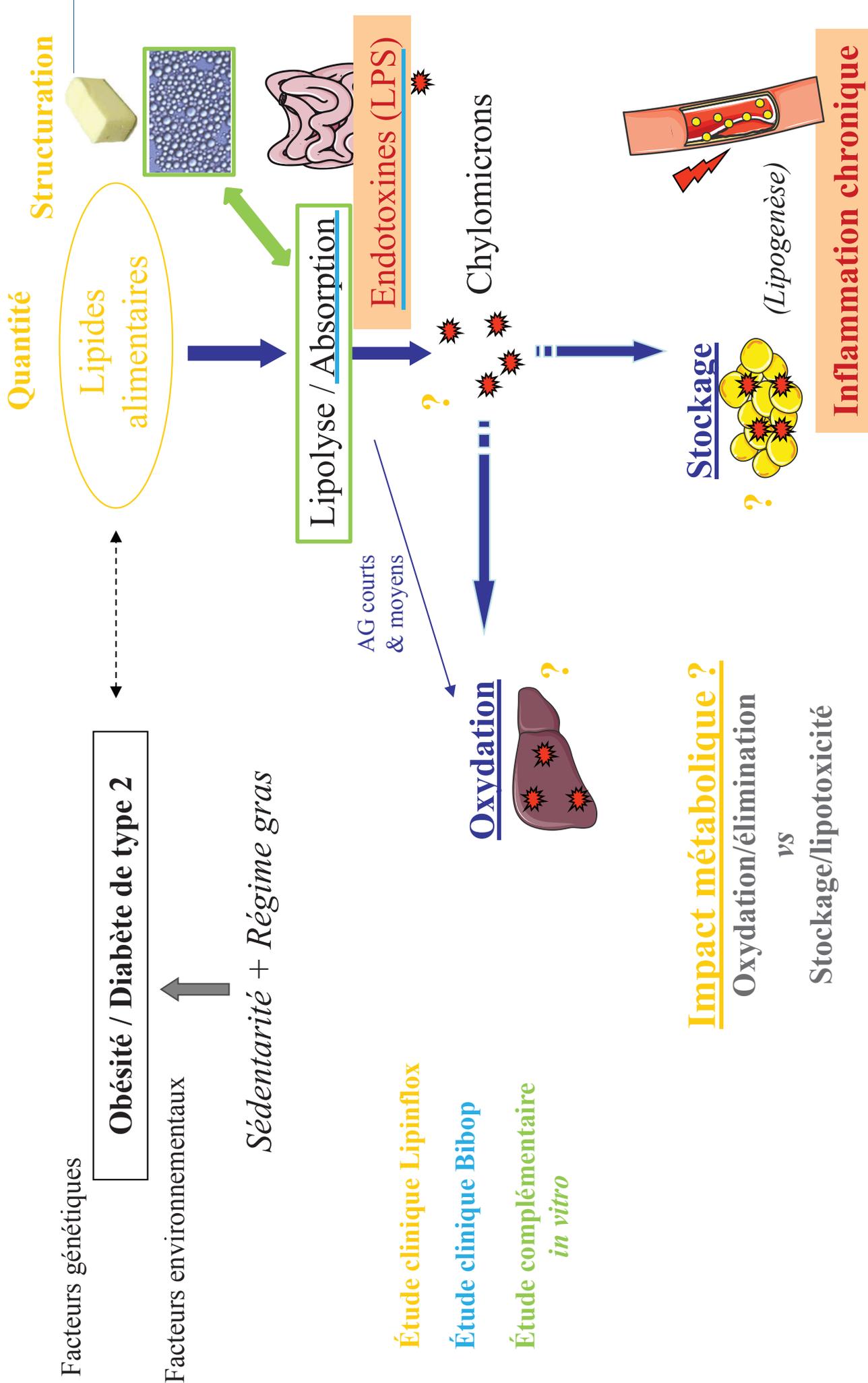


Figure 15. Problématiques étudiées au moyen des différentes études menées au cours de la thèse

-
- approfondir les connaissances quant aux effets de la composition et de la structure des émulsions sur leur absorption intestinale *in vitro* ;
 - étudier, chez l'Homme, l'impact de la digestion de matière grasse, en quantité et structure variables, sur l'endotoxémie postprandiale et évaluer la contribution des chylomicrons au transport des endotoxines ;
 - évaluer si des modifications de ces phénomènes postprandiaux auraient lieu chez l'obèse morbide après une chirurgie de by-pass gastrique, pouvant contribuer aux bénéfices métaboliques observés ;
 - estimer si ces phénomènes sont associés à une réponse inflammatoire, combinée aux transporteurs d'endotoxines.

Pour répondre à l'ensemble de ces objectifs, nous avons élaboré et mis en place deux études d'exploration chez l'Homme ainsi qu'une étude complémentaire *in vitro* sur lignée cellulaire humaine (**figure 15**, ci-contre). Dans un premier temps, le devenir des lipides alimentaires ainsi que l'endotoxémie associée ont été étudiés chez des sujets normo-pondérés et obèses modérés selon un protocole similaire, incluant la digestion de petits-déjeuners standardisés à teneur faible ou modérée en matière grasse non-émulsionnée (10 g *vs* 40 g), ou à teneur élevée en matière grasse émulsionnée (40 g). Dans un second temps, les effets de différentes émulsions sur leur absorption *in vitro* ont été testés sur cellules Caco-2. Dans un troisième temps, les absorptions de lipides et d'endotoxines ont été évaluées chez des patients en situation d'obésité morbide, avant et après chirurgie de by-pass gastrique, lors de tests de digestion d'une émulsion à 40 g de matière grasse. Les méthodologies respectives de chacune de ces études sont détaillées ci-après.

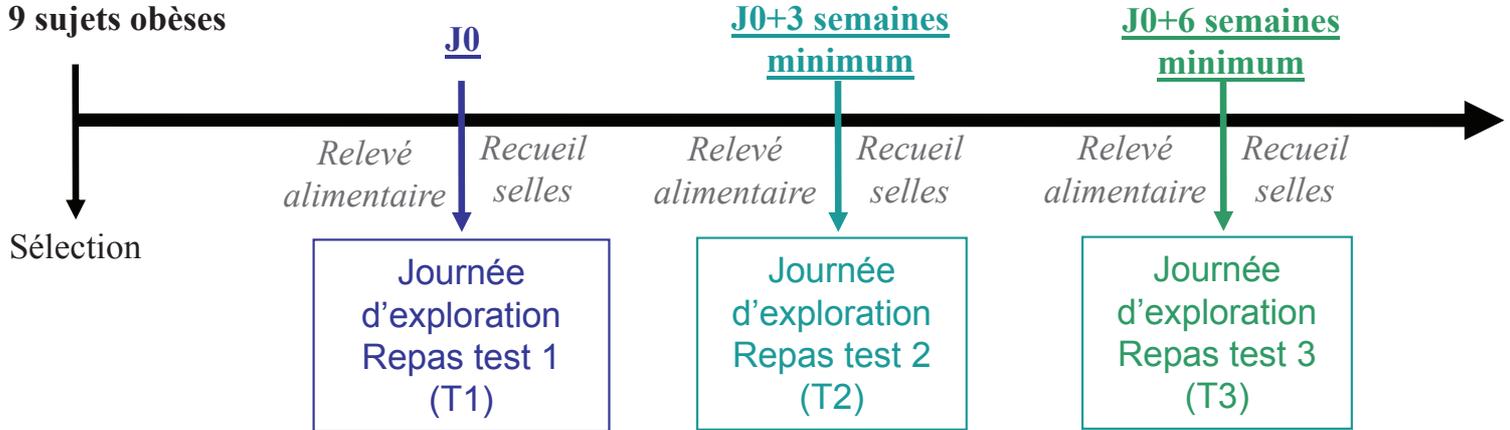
CHAPITRE 3 – MATERIELS ET METHODES

1. ETUDES CLINIQUES

Lipinflox

9 sujets normo-pondérés

9 sujets obèses



Bibop

5 sujets obèses morbides
(cohorte incomplète)



Figure 16. Déroulement des protocoles cliniques Lipinflox et Bibop

1.1. Etude LIPINFLOX

1.1.1. Plan d'étude et objectifs

Il s'agit d'une étude prospective, randomisée croisée, réalisée en ouvert et en aigu chez 10 sujets normo-pondérés et 10 sujets obèses.

Chaque sujet a réalisé 4 visites au Centre de Recherche en Nutrition Humaine – Rhône-Alpes (CRNH-RA), qui a reçu l'agrément pour la recherche sans bénéfice individuel direct : une visite d'inclusion (entre J-30 et J-14) et trois journées d'exploration métabolique, avec un délai de 3 semaines minimum entre chaque journée (**figure 16**, partie supérieure). Lors de ces trois journées métaboliques distinctes, les sujets volontaires à jeun depuis la veille au soir ont consommé l'un des 3 repas test (petit déjeuner). Chaque sujet a bénéficié de chacun de ces 3 repas dans un ordre aléatoire (après tirage au sort) et a donc été son propre témoin. La durée totale de l'étude a été de 11 semaines minimum pour l'ensemble des sujets.

Le but de cette étude était d'évaluer le devenir métabolique des lipides alimentaires variant par leur quantité ingérée (40 g vs 10 g) et/ou par leur structure (matière grasse non-émulsionnée vs finement émulsionnée), ainsi que l'absorption conjointe d'endotoxines du microbiote intestinal.

Ainsi, deux repas étaient à base de 40 g de matière grasse afin d'induire une réponse postprandiale marquée ; l'effet de la structure de la matière grasse a été étudié sur ces repas à 40 g. Un troisième repas a été choisi comme repas témoin avec seulement 10 g de matière grasse, quantité représentative de la contribution moyenne des lipides du petit déjeuner, conseillée dans les apports journaliers.

Afin de suivre le devenir métabolique de la matière grasse ingérée, celle-ci a été additionnée d'un mélange de traceurs. Ces traceurs lipidiques étaient des triglycérides dont chaque acide gras contenait 1 atome de l'isotope stable ^{13}C en position 1 sur la chaîne carbonée. Les triglycérides traceurs utilisés étaient la trioctanoïne, la tripalmitine et la trioléine, dont la structure représente les 3 principales familles d'acides gras présents dans la matière grasse laitière : acides gras courts & moyens, longs saturés et insaturés respectivement. Ils ont été utilisés sous forme de mélange à hauteur de la proportion respective de chaque famille d'acides gras dans la matière grasse laitière testée.

L'ordre d'ingestion des petits déjeuners avec les différentes quantités et structures en matière grasse a été décidé par tirage au sort et le calendrier des journées métaboliques a ainsi été fixé.

En dehors des journées d'exploration, les sujets devaient poursuivre leur alimentation et activité physique habituelles, hormis :

- la semaine précédant les journées d'exploration métabolique et les trois jours suivants, les sujets ont dû s'abstenir de consommer des aliments naturellement riches en ^{13}C ou en pré/probiotiques (cf. liste des aliments interdits, en annexe) ;

- durant les 48h précédant chaque journée métabolique, il a été demandé aux sujets de n'effectuer aucune activité physique intense et de ne pas consommer d'alcool ;

- la veille au soir de chaque test, les sujets devaient manger un repas standardisé établi par la diététicienne du CRNH.

Afin de s'assurer du respect de ces consignes alimentaires données par la diététicienne, il a été demandé aux sujets de remplir un relevé alimentaire sur 5 jours précédant les tests et sur les 3 jours suivants.

1.1.2. Les sujets

Recrutement

Les sujets ayant participé à cette étude ont été recrutés en région Rhône-Alpes, en particulier sur Lyon et ses alentours. Le recrutement a été effectué par le biais d'affichettes apposées en différents lieux publics de passage, et par le biais d'annonces dans la presse locale. Une base de données de volontaires déjà établie au CRNH nous a également beaucoup aidés pour le recrutement.

Critères d'inclusion/exclusion

Lors de la visite d'inclusion, le médecin du CRNH a contrôlé que le sujet répondait aux différents critères d'inclusion requis pour l'entrée dans le protocole.

Critères d'inclusion généraux et médicaux

→ communs à tous les sujets :

- sujets volontaires de sexe masculin,
- age compris entre 18 et 45 ans (bornes incluses),
- sujets non-fumeurs,
- poids stable (+/- 5 % de poids corporel) depuis 3 mois,
- sujets sédentaires ou ayant une activité physique modérée (< 4 h par semaine),
- cholestérol total < 2.6 g/L,

- triglycérides < 2.5 g/L sans traitement hypolipémiant,
 - glycémie < 7 mmol/L sans traitement hypoglycémiant,
 - gammaGT ALAT, ASAT < 3 fois la valeur normale,
 - une pression artérielle contrôlée :
- * systolique : < 140 mmHg *diastolique : < 90 mmHg

→ concernant les sujets normo-pondérés :

- indice de masse corporelle compris entre 18 et 25 kg/m² (bornes incluses),
- absence d'antécédents familiaux d'obésité au premier degré (chez les parents et la fratrie).

→ concernant les sujets obèses :

- index de masse corporelle compris entre 30 et 35 kg/m² (bornes incluses),
- tour de taille > 94 cm.

En parallèle, le médecin a également vérifié que le sujet ne présentait aucun des critères d'exclusion pouvant compromettre sa participation à l'étude.

Critères d'exclusion généraux

- claustrophobie,
 - allergies ou intolérances alimentaires connues (notamment aux produits laitiers),
 - consommation excessive d'alcool (> 40 g d'alcool par jour),
 - trouble du comportement alimentaire,
 - consommation de pré- ou probiotiques plusieurs fois par jour, pouvant interférer sur la qualité du microbiote intestinal :
- chicorée, salsifis, artichauts, légumes secs ;
 - produits laitiers fermentés au bifidus, Actimel®, yaourts aux fruits 0%, confiserie et biscuits allégés, lait enrichi en fibres, rhubarbe, prune, pruneaux ;
 - édulcorants et autres prébiotiques (fructo-et galacto-oligosaccharides, inuline, lactulose, polyols,...).

Critères d'exclusion médicaux et thérapeutiques

- traitement médical pouvant interférer avec le métabolisme des lipides : hypolipémiants, corticoïdes pendant plus de 8 jours, anorexigènes, médicaments à visée d'amaigrissement,
- traitement avec médicament ou complément alimentaire pouvant interférer avec le microbiote intestinal et l'état inflammatoire (antibiotiques, prébiotiques, probiotiques),
- antibiothérapie dans les 3 mois précédant le début de l'étude,
- CRP > 20 mg/L,
- épisode infectieux ou inflammatoire dans les 3 mois précédant l'étude,
- sujets atteints de gingivites,
- utilisation de laxatifs dans le mois précédant le début de l'étude,
- toute pathologie évolutive associée (pathologie cardiaque, diabète, hypertension artérielle, psychiatrique, rénale ou hépatique),
- présence de dyslipidémie familiale,
- affection sévère évolutive,
- état dépressif ou psychiatrique (traitement par antidépresseur ou à visée psychotrope),
- antécédents médicaux ou chirurgicaux jugés par l'investigateur comme étant non compatibles avec cette étude,
- don de sang durant les 2 mois précédant l'étude.

Calcul de l'effectif

L'effectif nécessaire pour cette étude a été calculé en prenant comme critère principal la variation du temps d'apparition du pic de triglycérides dans le plasma selon l'état émulsionné ou non de la matière grasse laitière ingérée au petit-déjeuner. D'après Armand et collaborateurs, 8 sujets sont suffisants pour mettre en évidence une variation de 1,1 h (± 1 h) dans le temps d'apparition des triglycérides dans le plasma, entre la digestion d'une émulsion à gouttelettes de 10 μm par rapport à une émulsion à gouttelettes de 1 μm administrées par sonde gastrique (Armand *et al.* 1999). Nous avons donc calculé qu'un effectif de 20 sujets devait nous permettre d'observer une différence du temps d'apparition des triglycérides de 0,5 h (avec un écart-type de 0,5 h) avec $P < 0.01$ et une puissance de test de 90 %. Le recrutement des sujets a été stratifié selon leur IMC (10 normo-pondérés et 10 obèses) afin d'étudier plus précisément l'effet supposé de l'IMC.

L'effectif choisi est également adapté pour répondre aux critères secondaires (la stratification permettant aussi d'étudier l'effet de l'IMC), en particulier :

- *Concernant la différence d'oxydation des lipides exogènes selon leur structuration :*

Dans une étude utilisant un traceur ^{13}C -triglycéride, 7 rats ont permis de montrer une différence significative de récupération du ^{13}C dans le CO_2 expiré avec $P < 0.01$ entre de la matière grasse laitière non émulsionnée et une émulsion de matière grasse laitière finement homogénéisée (Michalski *et al.* 2005). Nous devions donc pouvoir observer chez l'Homme, avec 20 sujets, des différences d'oxydation des lipides exogènes selon l'état émulsionné ou non de la matière grasse, avec $P < 0.05$ et une puissance de test de 90%.

- *Concernant la différence d'endotoxémie postprandiale selon la quantité de matière grasse ingérée :*

D'après une étude clinique publiée par C. Erridge (Erridge *et al.* 2007) et nos données personnelles, nous avons calculé qu'un total de 20 sujets devait nous permettre de détecter une différence d'endotoxémie de 0,1 UE/mL (avec un écart-type de 0.15) avec $P < 0.05$ et une puissance de test de 80%.

- *Concernant la comparaison entre les sujets normo-pondérés et obèses :*

D'après des données publiées par C. Binnert, un effectif de 8 sujets minces et 8 sujets obèses est suffisant pour mettre en évidence une différence d'oxydation des lipides après 6 heures de digestion d'un bolus de 30 g d'huile d'olive (pour l'oxydation de la trioléine: 6.0 ± 0.3 g chez les sujets sains vs 3.2 ± 1.0 g chez les sujets obèses, $P < 0.01$; tandis qu'aucune différence significative n'est observée pour l'oxydation de la trioctanoïne : 9.2 ± 1.2 g chez les sujets sains vs 8.1 ± 1.2 g chez les sujets obèses) (Binnert *et al.* 1998). Dans notre étude, les sujets normo-pondérés et les sujets obèses ont ingéré un mélange de traceurs représentatif de la proportion des différents types d'acides gras de la matière grasse laitière testée (acides gras à chaîne courte et moyenne, acides gras saturés à longue chaîne, acides gras insaturés). Ainsi, d'après les données de Binnert et ses collaborateurs, nous pouvions nous attendre à une différence d'oxydation cumulée des lipides exogènes de 2,6 g ($\pm 1,9$ g) entre les sujets normo-pondérés et les sujets obèses. Un effectif de 10 sujets par groupe doit ainsi nous permettre de détecter une différence significative de la quantité de lipides exogènes oxydés entre sujets de poids normal et obèses avec $P < 0.05$ et une puissance de test de 90%.

1.1.3. Repas tests

L'ensemble des sujets ont eu un petit déjeuner test comprenant, dans un ordre aléatoire :

- 40 g de matière grasse laitière anhydre (MGLA) non-émulsionnée tartinée sur 50 g de pain, accompagnée d'un verre de 160 mL de lait écrémé aromatisé,

- 40 g de MGLA finement émulsionnée dans 160 mL de lait écrémé aromatisé et accompagné de 50 g de pain,
- 10 g de matière grasse laitière anhydre non-émulsionnée tartinée sur 50 g de pain, accompagnée d'un verre de 160 mL de lait écrémé aromatisé.

Les compositions nutritionnelles des différents petits-déjeuners sont présentées dans le **tableau 12** et la **Table 1** (article) en 9.1.2 et 9.2.2, respectivement.

Formulation des produits tests

Le protocole étant financé en majeure partie par le CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière), des industriels membres du CNIEL s'étaient engagés à nous fournir les matières premières laitières nécessaires à la conduite de l'étude. Il était ainsi convenu que le lait écrémé (LE) en poudre soit fourni par Lactalis R&D. Il a été reconstitué, aromatisé à la vanille et traité UHT par Sodial-Candia R&D. La matière grasse laitière anhydre (MGLA) a été fournie par SOREDAB via leur filiale de production CORMAN. Un même lot de matière grasse et un même lot de lait écrémé en poudre ont été utilisés pour toute la durée du protocole. Une fois ces produits laitiers réceptionnés, j'ai réalisé moi-même la formulation finale des produits tests, selon un protocole établi au cours d'un période préalable de mise au point.

Les traceurs lipidiques ont, dans un premier temps, été mélangés à chaud afin d'obtenir un mélange homogène qui est congelé en différents aliquotes. Ces traceurs sont des molécules naturelles, non radioactives ; ils ont préalablement été contrôlés par un pharmacien praticien hospitalier (pharmacie du Centre Hospitalier Lyon Sud) afin de délivrer leur certificat final d'aptitude à la consommation.

Le mélange de traceurs a été ajouté à la matière grasse chaque veille de journée test, dans la cuisine du CRNH-RA :

- concernant la MGLA tartinée (non-émulsionnée), les traceurs lipidiques ont été incorporés comme suit :
 - un aliquot de mélange de traceurs a été décongelé en le chauffant, ce qui a également permis de rendre le mélange totalement liquide ;
 - parallèlement, une quantité précisément pesée de MGLA (10 g ou 40 g selon les cas) a été fondue à 70°C et mélangée aux traceurs lipidiques ;

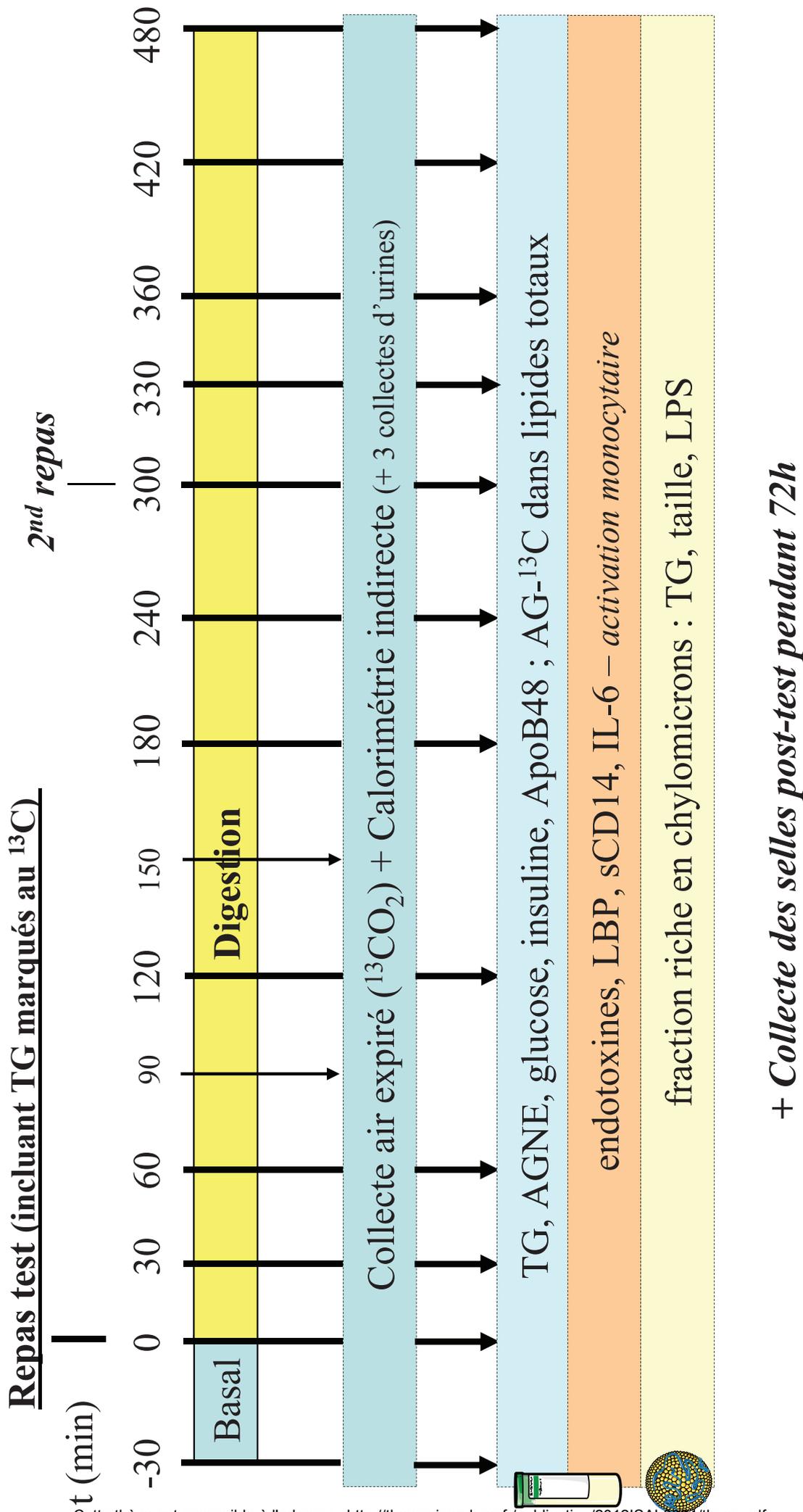


Figure 17. Déroulement d'une journée d'exploration Lipinflox

- le mélange ainsi obtenu (10 g ou 40 g de MGLA + traceurs) a été placé au réfrigérateur pour la nuit et ajouté (tartiné) sur les 50 g de pain au dernier moment le lendemain matin pour le petit déjeuner test.

- concernant l'émulsion :

- de la même manière que pour la MGLA tartinée, un aliquot de mélange de traceurs a été décongelé en le chauffant, la veille ;

- ce mélange de traceurs a alors été ajouté aux 40 g précisément pesée de MGLA fondue à 70°C ;

- ce mélange de MGLA et de traceurs lipidiques a été émulsionné dans un volume de lait écrémé aromatisé préchauffé à 37°C. Nous avons ainsi obtenu 200 mL d'émulsion test à 20% de matière grasse, qui après avoir refroidi au réfrigérateur pour la nuit, a été consommée dès le lendemain matin au cours du petit déjeuner test.

Second repas

Au bout de 5 heures de digestion du petit-déjeuner test (T300), un déjeuner d'un apport énergétique de 713 kcal réparties en 20% de protéines, 28 % de lipides et 51 % de glucides a été servi aux sujets. Ce déjeuner comportait 200 g de pâtes cuites, 100 g d'escalope de dinde, 10 g de beurre, 10 g d'huile d'olive, 50 g de pain et 100 g de compote. Pour l'ensemble des sujets, l'huile d'olive était incorporée aux pâtes chaudes tandis que le beurre était fondu sur l'escalope de dinde. Ce second repas ne contenait pas de traceurs lipidiques.

1.1.4. Journées d'exploration métabolique

Les journées métaboliques se sont déroulées de 7h00 à 17h30, chaque sujet arrivant au CRNH Rhône-Alpes à jeun depuis la veille au soir (12h de jeûne).

Chaque journée se divisait en trois parties (**figure 17**) :

- une période basale (T-30 à T0) au cours de laquelle les conditions basales (à jeun) étaient mesurées ;
- une période postprandiale de 5 heures (T0 à T300) consécutive à la prise du petit déjeuner servi à T0 avec la matière grasse test ;
- une période postprandiale de 3 heures (T300 à T480) suite à la prise du second repas (déjeuner) servi à T300.

L'ensemble du petit déjeuner (pain, matière grasse test et lait écrémé) a été consommé en 10 minutes, le second repas en 30 minutes.

Chaque sujet est resté en décubitus pendant les 8h30 de journée test, en évitant de dormir, et au cours desquelles ils n'ont eu droit de consommer que de l'eau en dehors des repas.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés (200 mL par journée test) à jeun et tout au long de la digestion des 2 repas afin de caractériser la cinétique d'hypertriglycéridémie postprandiale, les chylomicrons, l'endotoxémie et les marqueurs associés (transporteurs, cytokines). En parallèle, des mesures de calorimétrie indirecte ont été effectuées en continu sur la journée afin de calculer l'oxydation totale des nutriments. La journée a aussi été ponctuée par des breath tests, la plupart du temps au moment des prélèvements sanguins, afin de suivre l'apparition du ^{13}C dans le CO_2 expiré.

1.2. Etude BIBOP

1.2.1. Plan d'étude et objectifs

Il s'agit d'une étude de suivi longitudinal prospective et transversale, portant sur 20 patients obèses morbides opérés d'un by-pass gastrique et suivis de façon conventionnelle. Les patients ont été opérés dans le service de chirurgie du Centre Hospitalier Edouard Herriot à Lyon, par le Dr Maud Robert, puis recrutés au CRNH-RA comme volontaires.

Les objectifs de ce protocole sont d'évaluer, suite à la digestion d'un petit déjeuner test à base de 40 g de MG, l'évolution postprandiale de l'endotoxémie, des transporteurs des endotoxines et de certaines cytokines inflammatoires, avant et 3 mois après l'opération (**figure 16**, partie inférieure). Il est également prévu d'étudier les changements microbiologiques du microbiote intestinal.

L'étude est actuellement toujours en cours, 5 patients ayant terminé à ce jour leur participation au protocole. Cette étude sur l'endotoxémie métabolique, avant et après by-pass gastrique, a fait l'objet d'un financement de recherche clinique translationnelle INSERM/DHOS et a été inclus, par la suite, dans un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) interrégional (Lyon et Clermont-Ferrand), ayant pour objectif principal d'évaluer le besoin protéique des patients obèses morbides, opérés d'un by-pass gastrique ou d'une *sleeve* gastrectomie, au cours de la perte de poids rapide initiale.

1.2.2. Technique chirurgicale du by-pass gastrique

Toutes les interventions de by-pass gastrique ont été réalisées par le même opérateur, selon une procédure identique reproductible bien décrite (Lonroth *et al.* 1996). L'intervention a été effectuée par laparoscopie, avec 6 trocarts et consiste en un court-circuit gastrique sur anse en Oméga. Elle a débuté par une section gastrique première afin de réaliser un réservoir gastrique de 40 mL. La première anse grêle a ensuite été anastomosée avec le petit réservoir gastrique en oméga, de façon latéro-latérale par agrafage mécanique. L'anse biliaire, qui a été repérée, a ensuite été sectionnée. Une anse alimentaire longue de 1m50 a alors été confectionnée, puis anastomosée à l'anse biliaire, de façon latéro-latérale par agrafage mécanique également. La durée opératoire est en moyenne de 135 minutes et la durée moyenne de séjour hospitalier de 4 jours, le temps que les patients reprennent une alimentation orale satisfaisante.

1.2.3. Les patients

Recrutement

Les patients éligibles ont été sélectionnés par le chirurgien après validation de l'indication de by-pass gastrique à la réunion de concertation pluri-disciplinaire d'obésité organisée de façon mensuelle dans le service du Pr Martine LAVILLE au Centre Hospitalier Lyon Sud. Après la visite d'inclusion réalisée au CRNH-RA, les patients ont été ou non inclus dans l'étude.

Critères d'inclusion/exclusion

Les critères d'inclusion pour cette étude sont les suivants :

- sexe masculin ou féminin,
- âge compris entre 18 et 60 ans,
- indice de masse corporelle $> 40 \text{ kg/m}^2$,
- bilan biologique considéré comme satisfaisant par l'investigateur,
- sérologies HIV et HCV négatives,

Par ailleurs, les sujets présentant les critères d'exclusion ci-dessous n'ont pu participer à l'étude :

- antécédents médicaux ou chirurgicaux (jugés par l'investigateur comme étant non compatibles avec l'étude),

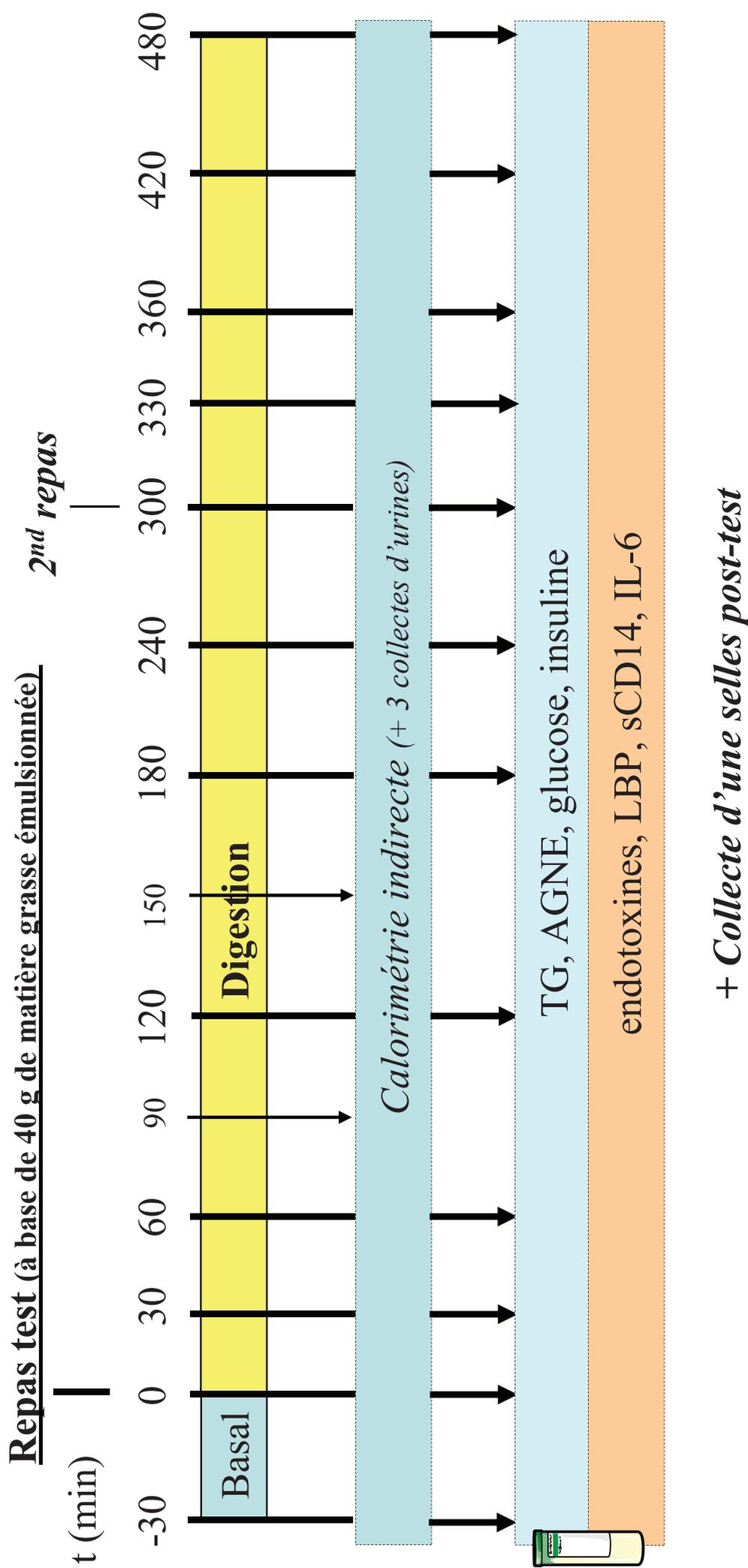


Figure 18. Déroulement d'une journée d'exploration Bibop

Tableau 8. Composition macro-nutritionnelle du petit-déjeuner test à base de 40 g de matière grasse émulsionnée (protocole Bibop)

	Quantité (g ou mL)	Glucides (g)	Protéines (g)	Lipides (g)
Matière grasse laitière				
anhydre *	40	-	-	40
Lait écrémé **	160	7,5	5,3	0,3
Biscottes (x4)	30	21,4	2,8	2,2
Total (g)	230	28,9	8,1	42,5
Energie (kcal)	530,5	115,6	32,4	382,5
% de l'énergie		22	6	72

* Profil en acides gras des triglycérides inclut 68,6% d'acides gras saturés, 28,1% d'acides gras monoinsaturés et 3,3% d'acides gras polyinsaturés.

** Aromatisé à la vanille.

- maladie évolutive cardiovasculaire ou néoplasique,
- infection sévère dans les 3 mois précédant l'inclusion,
- hypercorticisme et dysthyroïdie non contrôlée,
- pathologie neuro-musculaire connue : myopathie, myasthénie, rhabdomyolyse, paraplégie, hémiparaplégie,
- pathologie inflammatoire chronique ou aiguë durant les 3 mois précédant l'inclusion,
- femmes enceintes ou allaitant ; pour les femmes en âge de procréer : dosage β -hCG positif et absence de contraception réputée comme fiable (contraceptif oral, stérilet, implant ou patch hormonal, abstinence),
- CRP < 20 mg/L,
- personne traitée par ou ayant arrêté un traitement depuis moins de 3 mois précédant l'inclusion par corticoïdes, immunosuppresseur, anabolisant, hormone de croissance,
- personne présentant un état psychiatrique instable,
- don de sang dans les 2 mois précédant l'étude,
- consommation importante d'alcool (> 2 à 3 verres par jour en fonction du sexe) ou présence d'une toxicomanie,
- tabagisme important (> 10 cigarettes / jour ou équivalent en cigare ou tabac à pipe),
- sujets intolérants ou présentant une allergie aux produits laitiers,
- activité sportive intense (> 5 heures / semaine),
- consommation de pré- ou pro-biotiques plusieurs fois par jour, pouvant interférer sur la qualité du microbiote intestinal (chicorée, salsifis, artichauts, légumes secs ; produits laitiers fermentés au bifidus, Actimel®, yaourts aux fruits 0%, confiserie et biscuits allégés, lait enrichi en fibres, rhubarbe, prune, pruneaux ; édulcorants et autres prébiotiques (fructo-et galacto-oligosaccharides, inuline, lactulose, polyols,...)),
- antibiothérapie dans les 3 mois précédant le début de l'étude.

1.2.4. Repas test et journées d'exploration métabolique

Pour des raisons pratiques et afin de pouvoir comparer les sujets de cette étude avec ceux ayant réalisé le protocole Lipinflox, nous avons choisi d'établir pour BIBOP une journée d'exploration métabolique très similaire à celle de Lipinflox. Ainsi, les patients sont arrivés au CRNH à jeun depuis la veille au soir et une voie veineuse périphérique leur a été posée. Les prises de sang et les mesures de calorimétrie indirecte ont été réalisées tout au long des 8 heures d'exploration, se découpant en trois périodes successives (**figure 18**) :

- les conditions basales (à jeun) de T-45 à T0,
- la 1^{ère} période postprandiale suite au petit-déjeuner test, servi à T0, d'une durée de 5 heures,
- la 2^{nde} période postprandiale consécutive à la prise du déjeuner, servi à T300, d'une durée de 3 heures.

Le petit déjeuner test était composé de 40 g de matière grasse laitière émulsionnée dans 160 mL de lait écrémé, accompagnée de 4 biscottes, soit un total de 530,5 kcal avec 42,5 g de lipides (72 % de l'énergie), 8,1 g de protéines (6 % de l'énergie) et 28,9 g de glucides (22 % de l'énergie) (**tableau 8**).

Le second repas servi au bout de 5 h comportait 204 kcals, composé de 100 g de mixé de dinde et 250 g de purée de carottes comprenant 24,7g de protéines (48% de l'énergie), 7,2g de lipides (32% de l'énergie) et 10,3 grammes de glucides (20% de l'énergie).

1.3. Méthodes

1.3.1. *Caractérisation physico-chimique de la matière grasse test*

Granulométrie laser

Dans le cadre de l'étude Lipinflox, nous avons utilisé la technique de granulométrie laser, à la fois pour caractériser notre émulsion test mais aussi pour décrire la classe des lipoprotéines riches en chylomicrons, comme nous le verrons par la suite (§ 6.3.9).

La granulométrie laser date des années 1970 ; c'est une technique qui permet la mesure de la taille des particules et qui permet également de déterminer leur fréquence statistique en fonction de leur taille.

Cette technique est basée sur la diffraction de la lumière. Elle s'appuie sur la théorie de Fraunhofer qui utilise les hypothèses suivantes : les particules sphériques étudiées sont non poreuses et non opaques ; ces particules ont un diamètre supérieur à la longueur d'onde ; elles sont animées d'un mouvement aléatoire et diffractent la lumière avec la même efficacité quelle que soit leur taille. Selon Fraunhofer, l'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction sont fonction de la taille des particules. Ainsi, plus la particule est grosse, plus elle dévie de lumière, et plus l'angle de déviation par rapport de propagation sera faible.

La théorie ci-dessus est cependant limitée, elle ne s'applique qu'à des particules de taille supérieure à la longueur d'onde. Dans le cas où le diamètre des particules est similaire ou inférieur à la longueur d'onde, la théorie de Fraunhofer ne suffit plus et on doit appliquer la théorie de Mie.

Dans le cadre de cette théorie, on suppose que le faisceau laser est non seulement diffracté par les particules, mais qu'il est également réfléchi et diffusé. Par conséquent, la théorie de Mie nécessite une connaissance des propriétés optiques (indice de réfraction et d'absorption) des particules étudiées et du milieu de dispersion utilisé.

Pour des particules de l'ordre du nanomètre au micron, on utilise la granulométrie par diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering) aussi connue sous le nom de spectroscopie de corrélation de photons (Photon Correlation Spectroscopy). La méthode de mesure repose sur la détermination de la vitesse des particules colloïdales lorsqu'elles sont soumises au mouvement brownien. Elle donne ensuite accès au diamètre hydrodynamique des particules en utilisant la loi de Stokes-Einstein.

Durant ma thèse, j'ai eu accès à deux types de granulomètre :

- un granulomètre Mastersizer2000 (Malvern, Royaume-Uni), exploitant la théorie de la diffraction, présent sur le site industriel de Candia, et avec lequel j'ai effectué les premières analyses de l'émulsion test ;
- un granulomètre Zetasizer NanoS (Malvern, Royaume-Uni), exploitant la théorie de la diffusion de la lumière, acquis par la suite par le laboratoire, avec lequel j'ai réalisé l'ensemble des mesures de diamètre hydrodynamique des lipoprotéines plasmatiques humaines mais aussi analysé de nouveau l'émulsion test pour validation.

Le diamètre moyen en volume-surface (d_{32}) et la surface spécifique (S) des gouttelettes d'émulsion test ont été caractérisés par granulométrie laser à diffraction de la lumière sur le Mastersizer2000 après dissociation des micelles de caséines et des agrégats par ajout de tampon EDTA et de 0.1% SDS (Michalski *et al.* 2002). Les indices de réfraction utilisés étaient 1,33 pour la phase continue et 1,46 pour la phase lipidique dispersée.

Microcalorimétrie différentielle à balayage

Cette technique permet de déterminer les caractéristiques thermiques des matériaux. Elle mesure les différences des échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence ; elle permet ainsi de déterminer les transitions de phase telles que les températures

de fusion, de cristallisation, de transition vitreuse des polymères ou encore les enthalpies de réaction.

Nous avons souhaité vérifier que l'ajout de traceurs et l'émulsification de la matière grasse ne modifiaient pas significativement la température de fusion et les formes cristallines de la matière grasse test. Nous avons donc étudié la MGLA pure ou additionnée des traceurs, émulsionnée ou non émulsionnée.

Les profils thermiques de fusion ont été caractérisés par microcalorimétrie différentielle à balayage (differential scanning calorimetry, DSC) sur un appareil Q1000 DSC (TA Instruments, New Castle, Etats-Unis) équipé d'un système réfrigérant (TA Instruments, New Castle, Etats-Unis) et de capsules hermétiques en aluminium. La calibration a été effectuée avec des standards d'indium (point de fusion 156,6°C) et de n-dodécane (point de fusion -9,56°C). Le gaz de purge évitant la condensation était l'hydrogène. Une capsule vide servait de référence. Les mesures ont été effectuées sur 2 à 4 mg d'échantillon. L'intégration des courbes de fusion et les mesures de températures correspondant à chaque pic ont été réalisés avec le logiciel Universal Analysis Software version 4.2 (TA Instruments, New Castle, Etats-Unis). Les pics de fusion ont été intégrés sur une ligne de base linéaire. Les échantillons ont été préalablement chauffés à 80°C dans l'appareil DSC pour assurer une fonte complète, et maintenus durant 5 min à cette température pour effacer le passé thermique des molécules de triglycérides. Ensuite, les échantillons ont été traités de manière à simuler la procédure appliquée au cours de la préparation des repas dans l'étude clinique pour obtenir des formes similaires de cristallisation des triglycérides : refroidissement à 4°C (-1°C/min), maintien durant 900 min à 4°C, puis enregistrement des profils de fusion de 4°C à 70°C à une vitesse de réchauffement rapide de 15°C/min pour mesurer la température à laquelle l'ensemble des triglycérides ont fini de fondre. Les analyses DSC ont été réalisées en duplicat.

Diffractométrie des rayons X

Cette méthode d'analyse physicochimique consiste à bombarder un échantillon avec des rayons X et à enregistrer l'intensité de rayons X diffusée par chaque atome. Ces rayons diffusés par les divers plans atomiques interagissent les uns avec les autres. Ces plans agissent alors comme un réseau de diffraction pour ce type de rayonnement, ce qui permet de mesurer les distances interplanaires (ou encore distance réticulaire) selon la loi de Bragg. Les petites distances réticulaires sont observées dans la région $2\theta = 16-25^\circ$. Elles reflètent l'empilement transversal des chaînes hydrocarbonées et sont indépendantes des longueurs de chaîne. Elles

sont utilisées pour caractériser les différentes formes polymorphes α , β' et β des triglycérides (il s'agit de la région que nous avons utilisée).

Ainsi, dans les mêmes conditions que celles de DSC, les formes polymorphiques des cristaux de triglycérides dans les matières grasses (MGLA pure ou additionnée des traceurs, émulsionnée ou non émulsionnée) ont été mesurées par diffraction des rayons X avec un diffractomètre D8 Advance (Bruker, Allemagne) (λ Cu=1,54178 Å, 40kV, 30mA) équipé d'un détecteur Vantec (Bruker, Allemagne), d'une chambre thermostatée TTK450 et d'une unité de contrôle de la température TCU110 (Anton Paar, Graz, Autriche) reliée à un bain marie circulant (Julabo, Allemagne). Les profils de diffraction ont été enregistrés dans la plage angulaire $2\theta = 15-27^\circ$. Les distances réticulaires (d -spacings) ont été déterminées par la loi de Bragg. Chaque analyse a été effectuée en duplicat, comme celle de DSC, par le Dr S. Danthine, au Laboratoire de Science des Aliments et Formulation de Gembloux Agro-Bio Tech (Université de Liège, Belgique).

1.3.2. Inclusion des sujets

Lors de la visite d'inclusion, chaque sujet a été informé sur les buts, la nature et les risques possibles de l'essai auquel il allait participer et l'investigateur a recueilli leur consentement éclairé et signé.

La visite d'inclusion s'est déroulée en trois temps, au CRNH :

- un temps « médical » comportant un interrogatoire sur les antécédents personnels et familiaux et sur les traitements médicaux en cours ainsi qu'un examen médical standard (mesures du poids corporel, du rapport taille/hanches, de la pression artérielle) ; les sujets ont également été interrogés sur leurs antécédents d'allergie aux produits laitiers.
- un temps « biologique » avec réalisation de prélèvements sanguins à jeun :
 - ✓ dans le cadre de l'étude Lipinflox : bilan inflammatoire (C-reactive protein, CRP), bilan lipidique complet (cholestérol total, HDL et LDL ; triglycérides), bilan hépatique (ASAT, ALAT, gamma-GT) ainsi qu'une glycémie veineuse.
 - ✓ dans le cadre de l'étude BIBOP : détermination des sérologies HIV et Hépatite C, NFS-plaquettes, bilan glycémique (glycémie et HbA1C), bilan nutritionnel (albumine, transthyrétine = pré-albumine), bilan inflammatoire (CRP), bilan hépatique (ASAT, ALAT, GammaGT), bilan lipidique

(cholestérol total, LDL et HDL ; triglycérides), un bilan ionique et hormonal (ionogramme : Na, Cl, K, Ca, P, réserve alcaline, parathormone, urée, créatinine) et dosage de la β -hCG pour les femmes en âge de procréer.

- un temps « diététique » consistant en une enquête alimentaire réalisée pour connaître l'apport énergétique, la répartition des nutriments et la consommation de produits laitiers (fréquence, quantité, type de produits laitiers) des sujets.

A la suite de cette visite, les critères cliniques et biologiques d'inclusion et d'exclusion ont été vérifiés et l'admission définitive de chaque sujet a ainsi été établie. Les sujets ont été informés par téléphone de leur participation à l'étude, ou en cas de non-admission des motifs de leur non-inclusion.

1.3.3. Mesures anthropométriques

Les sujets ont été pesés grâce à une balance numérique calibrée (SECA©). Leur taille a été mesurée à l'aide d'une toise, leurs tours de taille et de hanche avec un ruban à mesure.

Dans le cadre de l'étude Bibop, la composition corporelle des sujets a été évaluée par la technique de l'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$). Cette méthode repose sur le principe que la masse maigre corporelle contient une proportion fixe d'eau, à savoir 73 % de l'eau corporelle totale. A partir de l'estimation de l'eau corporelle totale, on peut donc calculer la masse maigre.

Pour déterminer le volume d'eau corporelle totale, 70 mg d'eau deutérée ($^2\text{H}_2\text{O}$) / kg de poids corporel ont été bus par chaque sujet après un premier prélèvement d'urine basal ; deux prélèvements d'urine ont ensuite été réalisés 4 et 5 heures plus tard. La mesure de l'enrichissement isotopique en deutérium de ces 3 prélèvements ainsi que de la quantité d'eau deutérée ingérée permet alors de calculer l'espace de dilution de l'isotope, correspondant à l'eau totale de l'organisme. La masse grasse est finalement calculée en soustrayant la masse maigre au poids total du sujet.

1.3.4. Dosages bio/immuno-chimiques

Après avoir prélevé les échantillons sanguins à l'aide d'un cathéter brachial dans les tubes appropriés (avec ou sans EDTA, apyrogènes ou non), le plasma a été séparé des éléments figurés par centrifugation (1500 g, 4°C, 10 min). Celui-ci a été soigneusement aliquoté et placé à -20°C ou -80°C selon le type de dosage ultérieur.

Les différents dosages ont tous été effectués au centre de Biochimie Lyon Sud (services des docteurs J. Draï et A. Charrié), excepté pour les endotoxines dont la mesure par le test du lysat d'amœbocytes de limule (LAL) a été réalisée à l'IMBL, sur le campus de La Doua.

Les concentrations plasmatiques en glucose, triglycérides et cholestérols total, HDL et LDL ont été déterminées par méthode enzymatique colorimétrique sur un appareil AU 2700 Beckman Coulter® (O' Cllagan's mils, Irlande). L'insulinémie a été déterminée par radio-immuno essai (CISBIO Bi insuline IRMA, France). Le dosage des acides gras non estérifiés plasmatiques a été réalisé par méthode enzymatique Wako® (Neuss, Allemagne) sur un appareil PENTRA 400 Horiba ABX® (Montpellier, France).

Les concentrations plasmatiques en ApoB48 ont été dosées par ELISA avec le kit Human Apo B-48 ELISA KIT (Gentaur, France) selon les recommandations du fabricant, par l'équipe du Dr D. Lairon à Marseille (UMR Nutrition, Obésité et Risques Thrombotiques).

Les concentrations plasmatiques en sCD14 et LBP ont été dosées par ELISA à l'aide des kits Human LBP ELISA kit (CliniSciences, France) et Human Soluble CD14 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, France), respectivement. Les échantillons ont été préalablement dilués au 1/400 et 1/1000 pour sCD14 et LPB, respectivement.

L'interleukine-6 plasmatique a également été dosée en cinétique par ELISA grâce au kit Human IL-6 Ultrasensitive ELISA kit (Invitrogen, France). Les échantillons des sujets normo-pondérés ont été dosés purs tandis que les échantillons des sujets obèses ont été dilués au 1/2.

1.3.5. Séparation des lipoprotéines

La séparation a été réalisée sur plasma frais, conservé à 4°C au maximum une nuit afin d'éviter toute altération des particules. Nous avons procédé à la séparation de la fraction dite riche en chylomicrons par la technique courante d'ultracentrifugation qui repose sur la flottation des lipoprotéines en fonction de leur densité.

Fraction riche en chylomicrons

Pour chacun des prélèvements, 500 µL de plasma ont été aliquotés dans 2 tubes (2 x 250 µL) contenant chacun 850 µL d'eau ultra pure apyrogène. Chaque échantillon a ainsi été traité en dupliqua afin d'obtenir un volume suffisant de fraction, nécessaire aux analyses ultérieures (dosage des TG, granulométrie, dosage des LPS). Les échantillons ont été centrifugés à 12°C pendant 30 minutes à 80 000 rpm (soit 600 000 g) à l'aide d'une ultracentrifugeuse Kendro (Asheville, Caroline du Nord, Etats-Unis). Les surnageants ont été délicatement récupérés et

rassemblés dans un même tube afin de mesurer le volume de fraction récupéré (nécessaire au calcul de concentration des TG) ; différents aliquots ont ensuite été réalisés pour les diverses analyses.

Le dosage des TG et l'analyse granulométrique des fractions ont été réalisés immédiatement après le recueil.

1.3.6. Calorimétrie indirecte

Cette méthode est basée sur l'analyse des échanges gazeux respiratoires qui reflètent la combustion des substrats énergétiques. En effet, quel que soit le nutriment (lipide, glucide ou protéine), son oxydation complète fournit de l'eau et du dioxyde de carbone. On fait alors l'hypothèse que tout l'oxygène analysé dans l'air expiré est utilisé pour oxyder les nutriments et que tout le dioxyde de carbone provient de ces mêmes réactions oxydatives.

Les mesures de calorimétrie indirecte ont été réalisées, en période basale et de manière continue, heure par heure, tout au long des journées métaboliques. Pour cela, un canopi ventilé par un flux d'air constant a été placé sur la tête des sujets. Les échanges gazeux respiratoires (VCO_2 et VO_2 en mL/min) ont été mesurés et analysés minute par minute à l'aide d'un appareil Deltatrac (Datex instrument, Helsinki, Finlande), directement relié au canopi. Toutes les mesures ont été réalisées sur les sujets éveillés au repos, en décubitus et silencieux dans une pièce à thermo neutralité.

Avant chaque journée test, l'appareil de mesure Deltatrac a été étalonné avec un échantillon de gaz étalon de composition connue en CO_2 et O_2 ; la vérification de la calibration a été effectuée grâce à un test de brûlage à l'éthanol. L'appareil mesure la consommation d'oxygène et la production de dioxyde de carbone et calcule ensuite le Quotient Respiratoire : $QR = VCO_2/VO_2$. Ce QR permet d'estimer le type de substrat utilisé par l'organisme : $QR = 0,7$ pour les lipides, $QR = 0,8$ pour les protéines et $QR = 1$ pour les glucides. Afin d'évaluer l'oxydation protéique, il est nécessaire de connaître la concentration en azote urinaire que nous avons mesurée à partir de 3 collectes urinaires effectuées durant la journée test. L'ensemble des calculs sont détaillés au paragraphe 1.3 Calculs.

1.3.7. Breath test

Des collectes de l'air expiré ont été réalisées tout au long des 8h30 d'exploration (à jeun et en postprandial), à raison d'une collecte toutes les 30 ou 60 minutes, afin de déterminer l'enrichissement isotopique en ^{13}C du CO_2 expiré (cf. § 1.3.8 suivant), produit final de

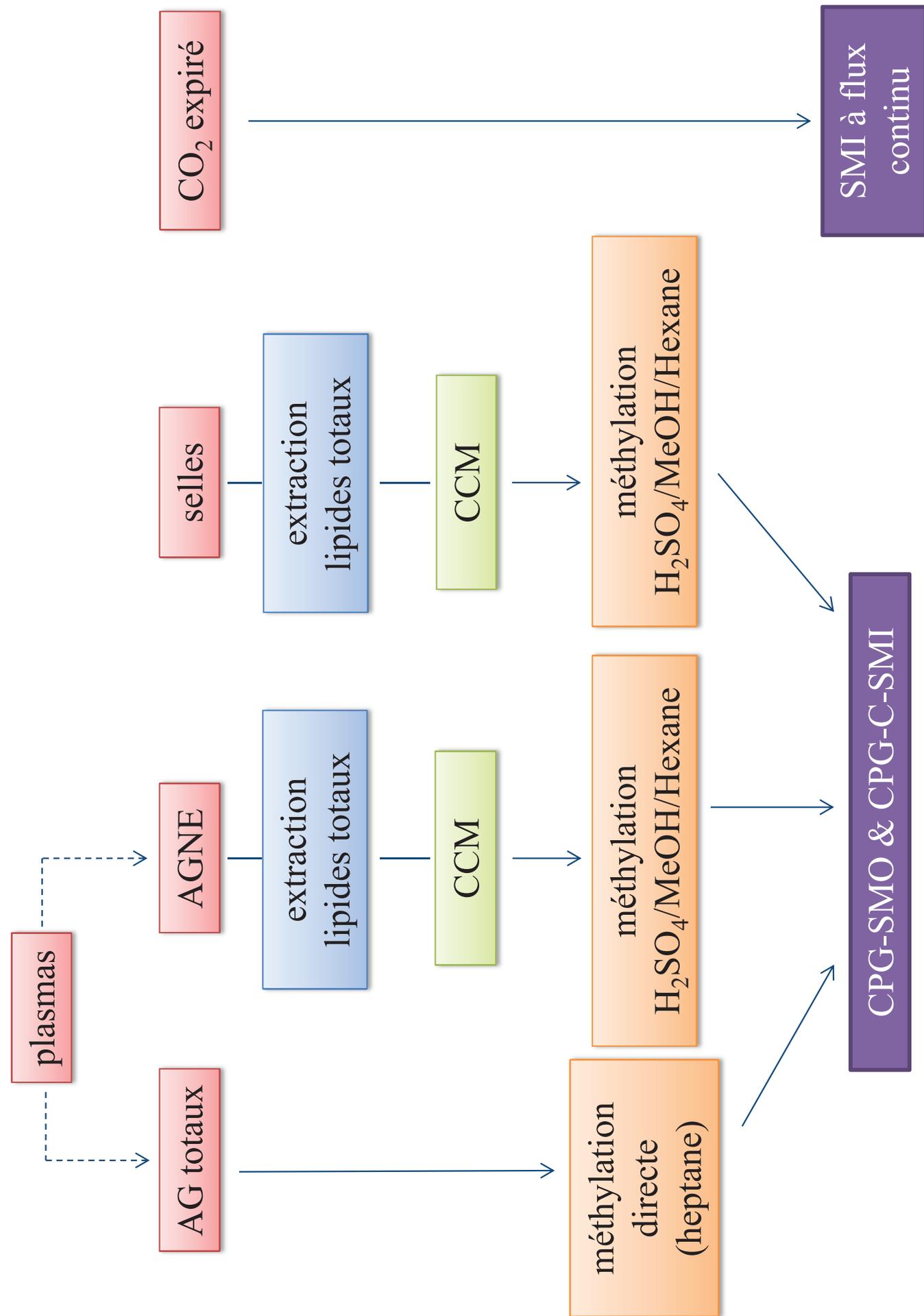


Figure 19. Traitements des échantillons lipidiques et analyses par spectrométrie de masse

l'oxydation des lipides marqués. Pour cela, les sujets ont dû souffler (3 expirations de suite) à l'aide d'une paille dans un tube en plexiglas. Deux collectes ont été rajoutées aux temps 720 min (soit à 20h le soir de test) et 1440 min (soit à 8h le lendemain de test) afin de vérifier le retour en condition basale.

1.3.8. Analyses isotopiques

Ces analyses ont été réalisées à partir d'échantillons de plasma, de selles et de CO₂ expiré. Cette partie sera abordée en deux temps : tout d'abord, en détaillant la préparation de chaque type d'échantillon puis en décrivant les trois techniques d'analyse utilisées, à savoir :

- la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse organique (CPG-SMO),
- la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse isotopique en mode combustion (CPG-C-SMI),
- la spectrométrie de masse isotopique à flux continu.

La **figure 19** représente un schéma récapitulatif des différentes étapes de traitements et d'analyses effectués selon la nature de l'échantillon.

Préparation/traitements des échantillons

✓ *Plasmas*

- Acides gras totaux

Les échantillons de plasma ont été soumis à une méthylation directe selon la technique de Lepage quelque peu modifiée (Lepage *et al.* 1986), en remplaçant le benzène par de l'heptane. Un standard interne, l'acide gras C17:0, a été ajouté à chaque fois aux échantillons. Ainsi, 100 µL d'acide heptadécanoïque (C17:0, 1 mM) sont ajoutés à 100 µL de plasma puis ils sont dilués dans 2 mL d'un mélange de méthanol / heptane (4 :1 v/v). 200 µL de chlorure d'acétyle sont ensuite progressivement ajoutés au mélange, sous agitation (réaction exothermique). Les tubes sont fermés sous azote et incubés 1 h à 100°C afin de permettre la transestérification des triglycérides. Cette réaction est stoppée en déposant les tubes sur glace pendant 10 min et par l'ajout de 1 mL d'une solution neutralisante de K₂CO₃ à 11 %. Les esters méthyliques sont extraits par un ajout supplémentaire de 0,25 mL d'hexane et agitation au vortex. Les phases sont séparées par centrifugation 10 min à 500 g à 4°C. La phase organique supérieure contenant les esters méthyliques d'acides gras est finalement récupérée dans des vials à fond

plat. Les extraits méthyliques peuvent être conservés à -20°C avant d'être analysés en CPG-SMO et en CPG-C-SMI.

- Acides gras non estérifiés (AGNE)

Une extraction des lipides totaux a tout d'abord été réalisée à partir des échantillons plasmatiques, selon la méthode de Folch (Folch *et al.* 1957). 100 μL d'acide heptadécanoïque (C17:0, 1mM) ont été ajoutés comme standard interne aux échantillons plasmatiques avant extraction. Brièvement, pour 800 μL de plasma, 3 mL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) sont ajoutés en vortexant le tout pendant 2 minutes. Une fois les tubes laissés 30 minutes au repos à $2-8^{\circ}\text{C}$, 1 mL de NaCl 9‰ et 1 mL de chloroforme sont additionnés au mélange et vortexés quelques secondes. Après centrifugation pendant 10 minutes à 2608 g, à 4°C , la phase organique inférieure contenant les lipides totaux est récupérée. Une deuxième extraction est réalisée par ajout de 1 mL de chloroforme sur la phase supérieure restante. L'ensemble est vortexé puis centrifugé pendant 10 minutes à 2608 g, à 4°C . Les phases organiques sont récupérées et additionnées aux premières. L'eau résiduelle est finalement piégée et éliminée par ajout de Na_2SO_4 . L'ensemble est ensuite évaporé sous azote. Les culots secs peuvent être conservés à -20°C jusqu'à leur séparation par chromatographie sur couche mince (CCM).

Ces culots secs lipidiques sont repris avec 30 μL de chloroforme, volume déposé en totalité sur plaque de silice (Merck G60, 20 cm x 20 cm x 0,25 mm) en respectant un intervalle de 2 cm entre chaque dépôt. La migration des échantillons s'effectue dans une cuve en verre avec un mélange hexane-éther-acide acétique (120:30:1,5, v/v). Les spots des différentes classes lipidiques sont révélés par pulvérisation de primuline (Sigma) et ensuite visualisés sous UV à 365 nm.

Le Rf (retardation factor ou rapport frontal : ratio de la distance parcourue par l'échantillon (cm) / distance parcourue par le solvant (cm)) est calculé pour chaque tache ainsi identifiée grâce aux Rf de références connues. Les fractions de silice contenant les AGNE sont grattées, récupérées dans des tubes en verre et lavées par 1,5 mL de chloroforme/méthanol (2:1, v/v) pour en extraire les lipides concernés. Après un repos de 5 minutes à $2-8^{\circ}\text{C}$, les échantillons sont centrifugés à 1159 g pendant 3 minutes à 4°C afin de séparer la silice (culot) du surnageant organique contenant les lipides. Celui-ci est récupéré dans un tube à méthylation. Un deuxième lavage de la silice est réalisé dans les mêmes

conditions. Les surnageants organiques sont rassemblés et évaporés à sec sous flux d'azote. Les culots secs peuvent être conservés à -20°C en attendant la méthylation.

Les AGNE ainsi isolés sont ensuite soumis à une méthylation par catalyse acide. Pour cela, 1 mL de mélange H_2SO_4 / méthanol (2%, v/v) est ajouté aux échantillons. Les tubes sont fermés sous azote et laissés 1 h à 100°C . La réaction de méthylation est stoppée en plaçant les tubes sur glace pendant 10 min et par l'ajout de 1 mL d'une solution neutralisante de K_2CO_3 à 5 %. Une première extraction est réalisée par l'ajout de 1 mL d'hexane et agitation au vortex. Les phases sont séparées par centrifugation pendant 10 min à 2608 g à 20°C . La phase organique supérieure contenant les esters méthyliques d'acides gras est finalement récupérée dans un tube en verre ; une 2^{ème} extraction est alors réalisée sur la phase inférieure restante avec 1,5 mL d'hexane. La seconde phase organique récupérée est additionnée à la première. L'eau résiduelle est finalement piégée et éliminée par ajout de Na_2SO_4 . L'ensemble est ensuite transféré en vials et évaporé sous azote pour analyses ultérieures en CPG-SMO et CPG-C-SMI.

✓ Selles

Il a été demandé aux sujets (étude Lipinflox) de conserver l'ensemble de leurs selles, en pots à -20°C , pendant les 3 jours suivant chaque journée test et de les ramener au Centre de Recherche à l'issue du 3^{ème} jour. La qualité du recueil a été assurée par la transmission aux sujets d'une procédure détaillée lors de la remise des pots.

Les selles sont laissées une nuit à température ambiante pour une décongélation totale. Chaque selle est alors pesée et homogénéisée à la spatule.

Les lipides totaux ont été extraits à partir de 1 g de selles homogénéisées, selon la méthode de Foch modifiée (Folch *et al.* 1957). Brièvement, 9 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (1:1, v/v) et 1 mL de standard interne (acide heptadécanoïque, C17:0, 10 mM) sont ajoutés au 1 g de selles ; l'ensemble est homogénéisé au Polytron. Cet extrait est centrifugé pendant 10 min à 465 g puis la totalité des surnageants des extraits de selles sont récupérés et conservés à -20°C .

Les différentes classes lipidiques sont ensuite séparées par CCM. Pour cela, 50 μL d'un nouveau standard interne (glycéryl-triheptadécanoate TG-C17:0, 3,3 mM) sont ajoutés à 2 mL d'extrait de selles. L'ensemble est mélangé et réduit sous azote à 200 μL . Au final, 20 μL d'extrait concentré sont déposés sur plaque de silice. Seuls les spots des TG et des AGNE sont

récupérés ; les conditions de migration et de lavage de la silice étant les mêmes que celles décrites précédemment pour les AGNE plasmatiques.

Les fractions des lipides totaux, des AGNE et des TG ont chacune été méthylées et ainsi dérivées en esters méthyliques d'acides gras par la méthode H_2SO_4 /méthanol selon les mêmes étapes que celles décrites précédemment pour les AGNE plasmatiques.

Il est à noter que la récupération des spots des AGNE et des TG n'a été réalisée que pour les 11 premiers sujets (6 poids-normaux et 5 obèses) ; les CCM ont été arrêtées par la suite. En effet, nous avons constaté pour l'ensemble des sujets que les pertes fécales sous la forme d'AGNE marqués étaient quasi identiques à celles des lipides totaux marqués ; aucun des lipides marqués ingérés n'étaient donc perdus dans les selles sous la forme de TG, indiquant ainsi une absence de malabsorption des graisses de la part des sujets. Ceci a d'ailleurs fait l'objet d'un article paru en avril 2011 dans le journal *Rapid Communication in Mass Spectrometry* (cf. article en annexe).

✓ *CO₂ expiré*

Dans ce cas présent, les échantillons d'air expiré collectés dans des tubes en verre (Vacutainer®) n'ont pas été soumis à une préparation particulière. Ils ont été analysés directement en flux continu-SMI, après séparation chromatographique de H_2O , N_2 et CO_2 .

Techniques d'analyse par spectrométrie de masse

✓ *Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse organique (CPG-SMO)*

Ce type d'analyse s'appuie sur le couplage de deux méthodes permettant tout d'abord la séparation des esters méthyliques du mélange (Chromatographie en Phase Gazeuse) puis leur détection et leur identification (Spectrométrie de Masse).

L'échantillon est introduit et volatilisé dans un injecteur chauffé à haute température. Les molécules de l'échantillon sont volatilisées puis entraînées par un gaz vecteur inerte (ici l'hélium), qui joue le rôle de phase mobile, à travers une phase stationnaire liquide et polaire, fixée à l'intérieur d'une colonne capillaire, pour laquelle elles vont avoir plus ou moins d'affinité selon leur polarité. Il s'agit d'une chromatographie de partage. Chaque soluté (composé) est ainsi soumis à une force de rétention (exercée par la phase stationnaire) et une

force de mobilité (exercée par l'hélium). A la sortie de la colonne, les solutés arrivent via une interface sur un détecteur très sensible, le spectromètre de masse, ainsi qu'un enregistreur.

Le spectromètre de masse est constitué d'une source d'ionisation, d'un filtre de masse et d'un analyseur. L'ionisation et la fragmentation en ions de l'échantillon se produisent dans la source par bombardement d'électrons. Ces ions sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) dans le filtre de masse, qui, ici, est un quadripole. Le spectromètre de masse est l'un des détecteurs de CPG les plus sensibles puisque son seuil de détection est de l'ordre du picogramme (10^{-12} g). Ainsi, le couplage des deux méthodes permet la séparation des constituants du mélange et l'obtention du spectre de masse de chacun d'entre eux. Chaque composé présente un temps de rétention qui lui est propre et un spectre d'ions caractéristiques, ce qui permet de les identifier plus facilement.

Au laboratoire d'analyses du CRNH-RA (Centre de Recherche en Nutrition Humaine – Rhône-Alpes), le système chromatographique est constitué d'un chromatographe en phase gazeuse Agilent technologies 6890, d'un injecteur automatique Agilent 7683B et d'une colonne chromatographique Innowax (longueur 30 m ; diamètre interne 0,25 mm ; épaisseur de film 0,25 μm). L'injection est effectuée en mode « Splitless », c'est-à-dire sans division de l'échantillon, à 250°C avec un retard de purge de 1 minute. Le four dans lequel est placée la colonne est programmé à 55°C pendant 1 minute puis 170°C selon une rampe de 25°C/min puis 240°C selon une rampe de 7,5°C/min et laissé à 240°C pendant 4 min afin de maintenir une température suffisante pour garder les solutés en phase gazeuse pendant l'analyse. La détection par le spectromètre est réalisée en mode SCAN permettant d'obtenir le spectre de masse dans son ensemble (Gabert *et al.* 2011).

✓ *Spectrométrie de masse isotopique (SMI)*

La matière vivante est principalement constituée d'un mélange d'isotopes stables des 4 éléments chimiques principaux que sont le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote. L'isotope le plus léger est de loin majoritaire, tandis que les plus lourds ont une abondance beaucoup plus faible. La spectrométrie de masse isotopique permet justement de mesurer l'enrichissement ou l'appauvrissement global en isotope lourd de la molécule à analyser.

La SMI permet, comme la SMO, une mesure directe des abondances isotopiques d'atomes stables, c'est-à-dire du rapport entre molécule marquée et molécule non marquée ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$). La SMI permet néanmoins de mesurer des niveaux d'enrichissement plus faibles que ceux mesurés par SMO (0,001 % vs 0,5 à 1%) et nécessite

des quantités initiales de traceurs moins importantes. De plus, la SMI permet de détecter des molécules marquées même après dilution dans les différents compartiments de l'organisme. La singularité de cette méthode réside ainsi dans sa haute précision et la grande exactitude avec laquelle ces rapports sont déterminés.

Les analyses en SMI ont été réalisées au laboratoire du CRNH-RA sur un Isoprime GV Instruments (Manchester, Royaume-Uni) en couplage CPG-C et flux continu.

- Couplage CPG-C-SMI

Les constituants volatils (esters méthyliques) sont d'abord séparés par chromatographie en phase gazeuse (CPG, système identique à celui décrit précédemment pour la SMO). Chaque molécule est ensuite oxydée dans un réacteur de combustion à 850°C située en sortie de colonne GC. Il en résulte la formation majoritaire de CO₂ et d'H₂O, chaque atome de carbone présent dans la molécule étant susceptible de produire une molécule de CO₂. Le rapport isotopique ¹³C/¹²C du CO₂ produit est identique à celui de la molécule de départ. L'eau résiduelle est également éliminée après passage sur une membrane Nafion. Le CO₂ produit est alors introduit dans la source à impact électronique du spectromètre de masse afin d'ioniser les molécules en ions ¹²C¹⁶O₂⁺ et ¹³C¹⁶O₂⁺ selon le rapport isotopique initial de la molécule. L'étalonnage de l'appareil est effectué par l'introduction dans la source d'une quantité donnée de CO₂ de référence.

- Couplage flux continu

Cette méthode ne concerne que les échantillons de CO₂ expiré. Ces derniers étant déjà sous forme gazeuse, ils ont été injectés directement en SMI pour y être ionisés comme décrit précédemment. Du CO₂ à 3% dans l'hélium est utilisé comme contrôle qualité.

1.3.9. Granulométrie des lipoprotéines

Dans le cadre de l'étude Lipinflox, les mesures de granulométrie laser à diffusion de lumière ont été réalisées à partir de 100 µL de fractions riches en chylomicrons, à 25°C, à l'aide de l'appareil Zetasizer NanoS en utilisant, pour la phase aqueuse, 1,0658 cP comme viscosité et 1,33 comme indice de réfraction.

1.3.10. Mesure de l'endotoxémie (méthode LAL)

L'endotoxémie a été mesurée par le test du lysat d'amœbocytes de limule (LAL) (Hurley 1995). Ce lysat obtenu à partir d'hémolymphe de limule présente la particularité de réagir avec les LPS bactériens, même en très faible quantité. Ainsi, une méthode chromogénique est réalisable pour quantifier les endotoxines bactériennes. L'endotoxémie est exprimée en unités d'endotoxines/mL (UE/mL), elle correspond donc à une activité avec une équivalence d'environ $1 \text{ UE} \approx 100 \text{ à } 200 \text{ pg LPS}$, selon la nature du LPS. Cette méthode quantitative fait appel à l'activation d'un système enzymatique présent dans le lysat aboutissant à la formation d'une enzyme hydrolysant un substrat chromogénique ; l'hydrolyse du substrat conduit à la libération de para-nitro-aniline, responsable d'une coloration jaune dont l'intensité est mesurée par absorbance au cours du temps. Il s'agit donc d'une méthode chromogénique en cinétique. Son seuil de détection est de $0,005 \text{ UE/mL}$; la limite de détection dans le plasma est alors de $0,05 \text{ UE/mL}$ compte- tenu de la dilution au 1/10 des échantillons (cf. ci-après).

Différentes protéines dans le plasma sont capables d'interférer avec le dosage en liant les LPS ; c'est pourquoi, pour obtenir une mesure fiable, il est nécessaire la plupart du temps de diluer l'échantillon et de le chauffer.

Ce dosage d'endotoxines a été réalisé sur les plasmas (Lipinflox et Bibop) et les fractions riches en chylomicrons (uniquement Lipinflox), tous dilués au 1/10. La quantification est toujours effectuée en référence à une gamme étalon préparée à partir d'une endotoxine standardisée de contrôle d'E. coli O113:H10 sous forme lyophilisée. La solution standard d'endotoxine et l'eau apyrogène utilisées pour la réalisation des gammes ainsi que pour la reconstitution du réactif Chromo-LAL proviennent de chez Biogenic (Pérols, France).

Après décongélation sur glace, les échantillons ont été dilués au 1/10 dans de l'eau ultra pure apyrogène (Biogenic) puis chauffés à 70°C pendant 10 min afin de désactiver les substances interférentes (protéines telles que la LBP, par exemple). Ils sont ensuite placés au bain à ultrasons (Milton *et al.* 1997) pendant 5 min et vortexés 1 min avant le dépôt sur plaque. 100 μL de point de gamme et d'échantillons ont été déposés par puits sur microplaque. La gamme a été déposée en double tandis que les échantillons ont été déposés en triplicat avec, pour chaque échantillon, un 4^{ème} puits contenant une surcharge contrôle positive à $0,5 \text{ UE/mL}$, appelée « spike ». Ce spike permet de vérifier la récupération d'une quantité connue d'endotoxines ajoutées et de s'assurer ainsi que le test n'a pas été activé ou inhibé. D'après la procédure décrite à la fois par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (Food and Drug Administration, FDA, en anglais) et la

Pharmacopée européenne, la mesure de l'endotoxémie est valide lorsque la récupération du spike se situe entre 50 % et 200 % (Pharmacopée Européenne 2001).

Dans le cadre de l'étude Lipinflox, les récupérations de spike sur les plasmas et les fractions riches en chylomicrons étaient en moyenne de 132 ± 2 % et 115 ± 4 %, respectivement. Dans le cadre de l'étude BIBOP, les récupérations de spike sur les échantillons plasmatiques étaient en moyenne de 151 ± 6 %.

Par ailleurs, l'ensemble des courbes standard obtenues présentait un coefficient de corrélation d'environ 0,99. Nous avons aussi systématiquement vérifié l'apyrogénicité de l'eau utilisée.

L'ensemble des mesures ont été réalisées sur l'appareil VERSAmax (Microplate reader, Molecular Devices, Etats-Unis). Les valeurs d'endotoxémie ont été directement calculées par le logiciel intégré Softmax Pro 5.3. En utilisant la moyenne des dix premières valeurs de densité optique (DO) dans un puits donné (DO initiale), le logiciel calcule le temps requis pour que l'incrément de DO dans ce puits soit de 0,1 ; ce temps est appelé « temps de démarrage de réaction » ou t_{DR} et il est corrélé à la teneur en endotoxines. Les t_{DR} mesurés dans les puits contenant la gamme étalon ont permis d'obtenir la droite d'équation :

$$\log(\text{endotoxémie}) = a \times \log(t_{DR}) + b$$

1.3.11. Analyses génomiques par RT-qPCR

Nous avons souhaité étudier l'ARN intracellulaire du sang total des sujets normo-pondérés et obèses, inclus dans le protocole Lipinflox.

Pour cela, nous avons effectué des prélèvements sanguins spécifiques à l'aide de tubes PAXgene™ (Blood RNA Tube, Becton Dickinson, France) permettant le prélèvement, la conservation et la stabilisation de l'ARN intracellulaire en vue d'une isolation et d'une purification ultérieures pour le dosage en RT-qPCR. Les infirmières ont réalisé les prélèvements sanguins selon les instructions du fournisseur, et ce, aux temps T0, T300 et T480 min. Les tubes ont ensuite été placés à la verticale pendant au minimum 2 heures à température ambiante (18-25°C), puis à -20°C pendant 24 h afin de pouvoir finalement les stocker à -80 °C.

Les ARN totaux ont été extraits directement à partir des tubes PAXgene décongelés en utilisant le kit PAXgene™ Blood RNA kit (Qiagen, France) selon les instructions du fabricant. La quantification des ARN extraits a ensuite été effectuée par spectrophotométrie sur Nanodrop (Labtech), à 260nm, longueur d'onde à laquelle les acides nucléiques absorbent.

Le Nanodrop est capable de calculer la concentration (ng/ μ L) en ARN à partir d'1 μ L d'échantillon déposé. Le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} a également été calculé pour vérifier la pureté des ARN extraits (doit être compris entre 1,8 et 2).

La synthèse de brins ADNc a ensuite été réalisée à partir de 250 ng d'ARN totaux. Après avoir dénaturé les ARN (5 minutes, 65°C), un mix contenant des random hexamères, des désoxyribonucléotides (dNTP), des Oligo dT et la reverse transcriptase (RT, Superscript II, Invitrogen) est ajouté aux échantillons d'ARN. Les tubes ont été placés dans un MasterCycler (Eppendorf) pour suivre un programme prédéfini de différents paliers temps/température pendant lequel s'effectue la synthèse d'ADNc à partir de la matrice ARN grâce à la reverse transcriptase. Les produits de la rétrotranscription ont ensuite subi un traitement à la ribonuclease H (RNase H) pendant 20 minutes à 37°C afin de digérer les brins d'ARN au sein des hétéro-duplex ADN/ARN. Les échantillons d'ADNc ont été dilués au 1/60 ou au 1/20 selon le niveau d'expression des gènes, avant la quantification par qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction). Un « mélange PCR » a préalablement été préparé comportant les amorces sens et antisens et l'*Absolute qPCR Mix* (Abgene). Celui-ci contenait, entre autres, l'ADN polymérase ainsi que le SYBR™ Green I. Chaque PCR a ainsi été réalisée sur un volume final de 20 μ L contenant 5 μ L d'ADNc dilué et 15 μ L de « mélange PCR ». L'expression des gènes d'intérêt a été normalisée en mesurant l'expression d'un gène de référence, en l'occurrence HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase). Nous avons préalablement vérifié que son expression n'était pas influencée par les conditions expérimentales testées.

Le système de détection de l'ADN double brin utilisé au laboratoire est un émetteur fluorescent, le SYBR™ Green I. La cinétique de la réaction PCR est alors observée en suivant l'évolution de la fluorescence (proportionnelle à la quantité d'amplicons générés) en fonction du nombre de cycles. La qPCR repose donc, non pas sur une détection en point final des produits PCR formés mais sur l'analyse de la cinétique de réaction PCR par un système capable de détecter les produits formés après chaque cycle d'amplification. La quantification est toujours effectuée en référence à une gamme étalon amplifiée en parallèle des échantillons, déposés en double. La gamme est constituée de différentes dilutions de concentrations connues d'ADNc du gène d'intérêt. La détection et la quantification s'effectuent sur un RotorGene 6000 (Corbett Research) : il s'agit d'un thermocycler à air pulsé associé à un microspectrofluorimètre.

Tableau 9. Similarités et différences entre les méthodologies des protocoles cliniques

	LIPINFLOX	BIBOP
Repas test		
Petit déjeuner 10g tartine (avec traceurs)	X	
Petit déjeuner 40g tartine (avec traceurs)	X	
Petit déjeuner 40g émulsion	X (avec traceurs, avec pain)	X (sans traceurs, avec biscottes)
Déjeuner	X (713 kcal)	X (204 kcal)
Journée d'exploration métabolique		
Paramètres anthropométriques	X	X
Composition corporelle (eau deutérée)		X
Dosages bio/immuno-chimiques	X	X
Séparation des lipoprotéines	X	
Calorimétrie indirecte	X	X
Breath test	X	
Analyses isotopiques	X	
Granulométrie (FRCM)	X	
Mesures d'endotoxémie	X (plasma + FRCM)	X (plasma)
Analyses génomiques par RT-qPCR	X	
Extraction globules blancs et dosage ELISA de NF-κB	X	
FRCM : fraction riche en chylomicrons		

1.3.12. Extraction des globules blancs et dosage de NF- κ B

Le sang total a été prélevé sur tubes apyrogènes aux temps 0 et 300 minutes ; la séparation des globules blancs (leucocytes) a alors été réalisée immédiatement. Le sang total a tout d'abord été vigoureusement mélangé à une solution hypotonique (tampon à base de Tris, NaCl, MgCl₂ et eau) afin de faire éclater les globules rouges. Deux lavages successifs avec le même tampon ont ensuite été effectués par centrifugations (1500 g, 10 minutes, T° ambiante) et re-suspensions, afin d'enlever les débris cellulaires des globules rouges. Le dernier lavage a été effectué au PBS et les culots cellulaires, obtenus après centrifugation, ont été congelés à sec et conservés à -80°C jusqu'à l'envoi à l'équipe du Dr C. Malpuech-Brugère de Clermont-Ferrand (Unité de Nutrition Humaine), qui a ensuite réalisé la mesure de la translocation du facteur nucléaire NF- κ B. L'extraction puis le dosage de NF- κ B des noyaux ont été effectués selon le protocole détaillé dans le kit de dosage IMK 503 NF- κ B/p65 ActivELISA™ Kit (Imgenex-CliniSciences, France). Le principe de ce kit est de mesurer la sous-unité p65 libre des noyaux, par un protocole de Sandwich ELISA. L'anticorps anti-p65, placé sur la plaque, présente une forte affinité pour le p65 libre et la quantité de p65 lié est détectée par colorimétrie grâce à l'ajout d'un second anticorps anti-p65 conjugué à une phosphatase alcaline.

Les méthodologies des deux protocoles cliniques sont récapitulées dans le **tableau 9**.

1.4. Calculs

1.4.1. Paramètres de cinétique : t_{max} , C_{max} , aires sous courbes

Nous avons calculé l'aire sous courbe (ASC, et Area Under the Curve (AUC) en anglais) des différentes cinétiques étudiées en utilisant la méthode des trapèzes ; l'intégration a été réalisée sur les différentes périodes postprandiales (post-petit-déjeuner 0-300 min et post-déjeuner 300-480 min) ou sur la totalité de la journée d'exploration (0-480 min). Les ASC incrémentées (ASC_i ou iAUC en anglais) ont été calculées de la même manière en ne considérant que les valeurs supérieures à la valeur basale.

Les concentrations, deltas de concentration et diamètres maximum (C_{max} , Δ_{max} , d_{max}) ont été déterminés ainsi que le temps d'apparition de ces paramètres (t_{max}).

1.4.2. Oxydation des substrats énergétiques

A partir des données de calorimétrie indirecte, nous avons calculé les oxydations lipidiques, glucidiques et protéiques des sujets en utilisant les équations publiées par Ferrannini (1988) :

Oxydation des glucides :

$$G = 4,55 \text{ VCO}_2 - 3,21 \text{ VO}_2 - 2,87 \text{ N}$$

Oxydation des lipides :

$$L = 1,67 \text{ VO}_2 - 1,67 \text{ VCO}_2 - 1,92 \text{ N}$$

Oxydation des protéines :

$$P = 6,25 \text{ N}$$

ainsi que le Quotient Respiratoire Non Protéique : $\text{QRNP} = (\text{VCO}_2 - 0,774\text{P}) / (\text{VO}_2 - 0,966\text{P})$

En cas de lipogenèse, lorsque le QRNP est supérieur à 1, nous avons utilisé les mêmes équations, excepté pour l'oxydation glucidique (Simonson & DeFronzo, 1990) :

Oxydation du glucose (en cas de lipogenèse) :

$$G = 1,34 (\text{VCO}_2 - (4,88\text{N}))$$

Avec G, L et P : grammes de glucides, lipides ou protéines oxydés par minute ; VCO_2 et VO_2 en L/min ; N : grammes d'azote urinaire excrétés par minute.

L'oxydation protéique est évaluée à partir de l'excrétion azotée urinaire pendant la durée du test. Les protéines contenant une moyenne de 16% d'azote, la quantité de protéines oxydées se calcule comme $P = 6.25 \text{ N}$ avec N = débit d'excrétion d'azote sous forme d'urée dans les urines. Pour cela, nous avons dosé l'azote urinaire à trois moments : avant le petit-déjeuner (T0), avant le déjeuner (T300) et à la fin de la journée métabolique (T480) ; il a été déterminé par chemiluminescence.

1.4.3. Oxydation des lipides exogènes

Le pourcentage de lipides exogènes oxydés a été calculé à partir des données de calorimétrie indirecte et des breath tests. Ce calcul a été réalisé à partir de la formule de Binnert et ses collaborateurs (Binnert *et al.* 1998). Nous avons adapté la formule à l'utilisation des trois triglycérides marqués, comme suit :

Oxydation des lipides exogènes (en % de matière grasse ingérée) =

$$\frac{\{[\{AP CO_2(t) + AP CO_2(t_{-30})\} / 2] - AP CO_2(t_0)\} / 100 \times \dot{V} CO_2 \times 100}{\{(A) + (B) + (C)\} \times 22.4 \times dARF}$$

Avec : $(A) = \left\{ \left[AP^{13}TG C8:0 \right] / 100 \right\} \times \left[(0.09 / 473.66) \times 27 \right]$

$$(B) = \left\{ \left[AP^{13}TG C16:0 \right] / 100 \right\} \times \left[(0.30 / 810.30) \times 51 \right]$$

$$(C) = \left\{ \left[AP^{13}TG C18:1 \right] / 100 \right\} \times \left[(0.21 / 888.40) \times 57 \right]$$

Dans cette formule, AP CO₂ (t) est la valeur en Atome Pourcent (AP ; données de breath test) du CO₂ expiré au temps t, AP CO₂ (t₀) est la valeur en Atome Pourcent du CO₂ expiré au temps t₀, AP¹³TG est la valeur calculée en Atome Pourcent de chacun des trois TG traceurs et $\dot{V} CO_2$ est le taux de production de CO₂ expiré (données de calorimétrie indirecte).

Les poids moléculaires moyens de la trioctanoïne, tripalmitine et trioléine sont 473,66 g/mol, 810,30 g/mol et 888,40 g/mol, respectivement. Le nombre moyen de carbones de la trioctanoïne, tripalmitine et trioléine est de 27, 51 et 57, respectivement.

22,4 est le volume (en L) d'une mole de CO₂ et le dARF (dietary Acetate Recovery Factor) est un facteur de correction dû à la perte en ¹³C dans le cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de Krebs (égal à 0,505 pour les sujets de poids normal et à 0,453 pour les sujets obèses, (Antoun *et al.* 2010)).

1.4.4. Enrichissements isotopiques

Les résultats bruts en sortie de machine du CPG-C-SMI ou du SMI-flux continu sont exprimés en ¹³C delta ‰. Ils sont alors convertis en Atom Percent (AP) qui correspond au ratio du nombre d'atomes marqués par rapport au nombre total de carbones. Ces valeurs sont à leur tour converties en APE (Atom Percent Excess) en retranchant la valeur de base :

$$APE = AP - AP_0$$

Le traitement des résultats diffère ensuite selon la nature des échantillons.

✓ Plasmas

Les données sont transformées en mole percent excess (MPE) correspondant au pourcentage d'enrichissement en ^{13}C de la molécule d'intérêt, rapporté au nombre de carbones (n) de la molécule dérivée :

$$\text{MPE} = \frac{\text{APE} \times n}{100}$$

Nous avons ensuite calculé les concentrations plasmatiques en ^{13}C -acide palmitique et ^{13}C -acide oléique en multipliant l'enrichissement (MPE) par la quantité d'acides gras totaux (marqués et non marqués, obtenus par CPG-SMO) :

$$^{13}\text{C} \text{ AG} = \text{MPE} \times \text{AG}_{\text{totaux}}$$

✓ Selles

Aucun recueil n'ayant été fait en basal (c'est-à-dire avant les journées d'exploration métabolique), l'abondance basale AP_0 utilisée pour les calculs d'APE a été celle mesurée pour les plasmas à T_0 , en partant du principe que l'enrichissement naturel en ^{13}C des acides gras n'est pas différent entre les pools lipidiques du plasma et ceux des selles.

Les données ont ensuite été transformées en MPE comme indiqué ci-dessus.

Nous avons également calculé, pour chaque traceur, la quantité (moles) de traceurs excrétés (QTE) par jour en multipliant l'enrichissement (MPE) par la quantité d'acides gras totaux (marqués et non marqués, obtenus par CPG-SMO) rapporté au poids de la selle (P) :

$$\text{QTE}_{(\text{jour})} = \frac{\text{MPE} \times \text{AG}_{\text{totaux}}}{P} \times P$$

avec p le poids de la prise d'essai (soit 1g de selles)

Enfin, nous avons rapporté la quantité totale des traceurs excrétés sur les 3 jours de recueil (J1 à J3) à celle ingérée (I) lors du repas test. On obtient ainsi le CTR (Cumulative Tracer Recovery), en % de la dose ingérée :

$$\text{CTR} \% =$$

✓ CO_2 expiré

Ne pouvant pas faire de distinction entre acides gras à l'état de $^{13}\text{CO}_2$, les résultats ont été conservés exprimés en APE.

Chapitre 3 – Matériels et méthodes

2. ETUDE COMPLEMENTAIRE *IN VITRO* DE L'EFFET DE LA STRUCTURE DES EMULSIONS

Bordeaux

4 émulsions alimentaires

Huile de colza émulsionnée avec du caséinate de sodium

“RA-CA”

Huile de colza émulsionnée avec de la lécithine de soja

“RA-LE”

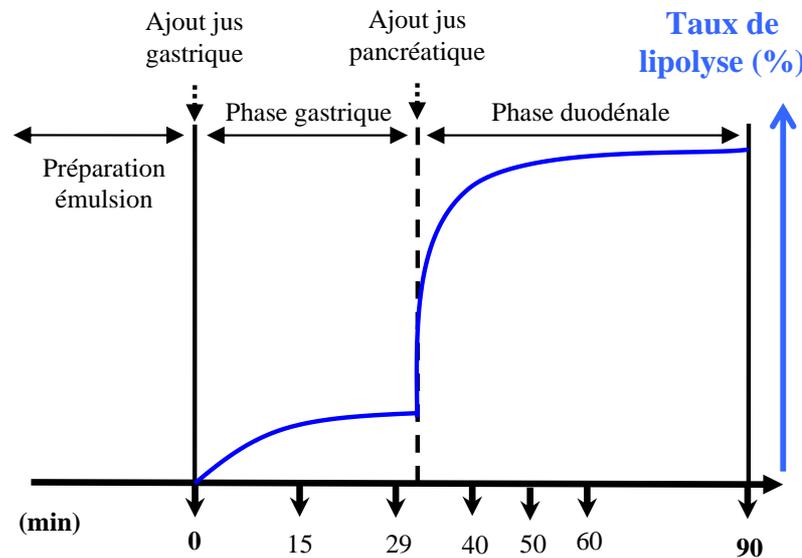
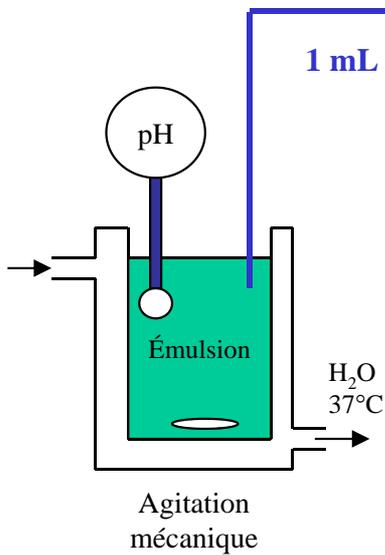
Oléine de MGL* émulsionnée avec caséinate de sodium

“OL-CA”

Oléine de MGL* émulsionnée avec de la lécithine de soja

“OL-LE”

Marseille



Lyon

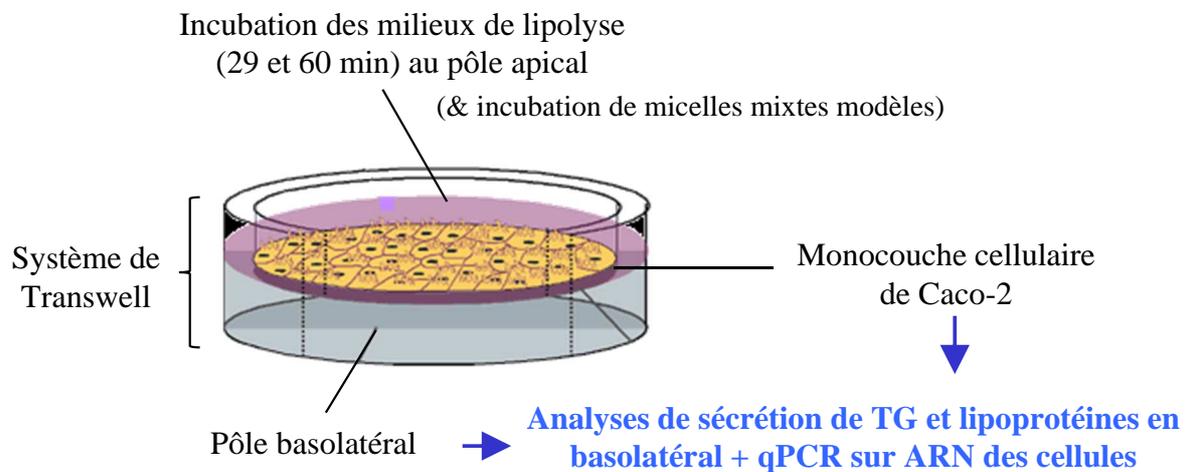


Figure 20. Méthodologie de l'étude complémentaire *in vitro*

* MGL : matière grasse laitière

2.1. Plan d'étude et objectifs

L'étude Lipinflox a eu pour but de montrer que la structure émulsionnée ou non de la matière grasse ingérée a un impact sur sa digestion et son devenir métabolique. Nous avons cependant utilisé une structure particulière d'émulsion (gouttelettes submicroniques entourées de protéines laitières) parmi la grande variété de structures possibles en alimentaire : la nature de la phase huileuse peut varier, ainsi que la nature des émulsifiants (protéines, lécithines, monoglycérides) et la taille des gouttelettes. Dans le contexte actuel des aliments dits « fonctionnels » contribuant à améliorer la santé ou réduire le risque de maladies, l'une des préoccupations principales est de sélectionner une forme de présentation des acides gras dont on maîtrise le devenir métabolique.

Nous avons donc étudié *in vitro* l'impact de deux paramètres, le profil en acides gras de la phase grasse émulsionnée et la nature du surfactant, sur la digestion des lipides et leur absorption par des cellules intestinales. Pour cela, nous avons développé un modèle *in vitro* intégrant les étapes de cinétique de lipolyse des émulsions par les lipases du tractus gastro-intestinal, la nature des produits de lipolyse, l'absorption intestinale de ces produits et la production de lipoprotéines par les entérocytes (**figure 20**).

Pour atteindre cet objectif, quatre émulsions de granulométrie contrôlée, à base de fraction oléique de matière grasse laitière ou d'huile de colza, en utilisant de la lécithine ou des caséines comme émulsifiant, ont été préparées à l'unité TREFLE (Bordeaux). A l'unité EIPL (Marseille), ces émulsions ont été soumises à une lipolyse *in vitro* simulant d'abord la phase gastrique puis la phase intestinale. Enfin, à l'unité CarMeN (Lyon), ces milieux lipolysés ont été mis en contact avec des cellules modèles d'entérocytes humains (Caco-2) de manière à suivre leur cinétique de digestion par les cellules, la composition et la structure des lipoprotéines ainsi sécrétées, et les niveaux d'expression génique des entérocytes en réponse aux différents types de substrats.

L'ensemble de cette étude *in vitro* a fait l'objet d'un article scientifique paru dans le journal Food & Function (2012). Par la suite, dans ce manuscrit, nous décrirons globalement les différentes étapes de cette étude ; les détails techniques approfondis sur certaines méthodes figurent dans l'article en 9.3.2.

2.2. Méthodes

2.2.1. Formulation et réalisation des émulsions alimentaires

Quatre émulsions ont été formulées à partir de deux huiles : fraction oléine de matière grasse laitière et huile de colza. Pour chaque type d'huile, la stabilisation des interfaces huile-eau est assurée soit par des phospholipides extraits de soja (lécithines) soit par des protéines d'origine laitière (caséinate de sodium). Nous avons ainsi obtenu les 4 émulsions suivantes :

- émulsion colza-caséinate (appelée RA-CA)
- émulsion oléine-caséinate (appelée OL-CA)
- émulsion colza-lécithine (appelée RA-LE)
- émulsion oléine-lécithine (appelée OL-LE)

Les matières premières ont été caractérisées en termes de composition en acides gras. La préparation d'émulsions de taille calibrée est indispensable pour la compréhension des phénomènes aux interfaces (notamment pour appréhender l'action d'enzymes interfaciales comme les lipases digestives) et pour la comparaison précise du comportement des milieux dispersés avec des systèmes en phase continue.

Des émulsions grossières de type huile dans eau (H/E) ont tout d'abord été réalisées à l'aide d'un appareil Ultraturax. La maîtrise de la taille des émulsions finales en termes d'uniformité et de reproductibilité a ensuite été réalisée à l'aide d'une cellule de Couette de manière à obtenir un diamètre moyen de gouttelettes d'environ 10 μm .

Les émulsions ont été formulées de manière à assurer une stabilité physique des gouttelettes d'huile (distribution homogène des tailles des globules gras) sur une durée de un mois. De l'azide de sodium (agent bactéricide) a été rajouté à l'ensemble des phases aqueuses.

2.2.2. Digestion *in vitro* des émulsions

Les émulsions ont ensuite été envoyées à Marseille et soumises à une lipolyse *in vitro* simulant tout d'abord la phase préduodénale en présence de lipase gastrique puis la phase intestinale en présence d'un mélange d'enzymes lipolytiques pancréatiques et de bile.

Il a ainsi fallu préparer deux types de solutions : une première mimant le jus gastrique humain à partir de lipase gastrique de lapin (la lipase gastrique humaine ne pouvant être produite *in vitro* à large échelle) et une seconde mimant le jus pancréatique humain à partir de lipase pancréatique porcine et de bile bovine.

Les conditions de mise en œuvre de ces expériences (concentrations en lipases, pH, rapport lipase/lipides, facteurs de dilution) ont déjà été décrites et sont basées sur des données recueillies lors d'études *in vivo*, notamment lors de protocoles cliniques chez l'Homme.

Les lipolyses gastriques et pancréatiques ont été réalisées dans une cuve thermostatée de 50 mL équipée d'un pH-mètre et d'un barreau magnétique. La lipolyse gastrique a eu lieu pendant les 30 premières minutes, puis le mélange d'enzymes pancréatiques et de bile a été rajouté et laissé pendant les 60 minutes suivantes. A différents temps d'intervalle (0, 15, 29, 40, 50, 60 et 90 min), des prélèvements du milieu réactionnel ont été effectués pour l'extraction des lipides totaux et des analyses ultérieures (**figure 20**) ; en parallèle, des prélèvements ont été spécifiquement réalisés aux temps 29 et 60 min et congelés immédiatement en vue de leur incubation ultérieure sur les cellules Caco-2 (**figure 20**).

2.2.3. Culture cellulaire de Caco-2 et traitements

Des cellules TC7, clones de la lignée cellulaire Caco-2, ont été cultivées en flasques de 75 cm² (Falcon, Becton Dickinson), sous une atmosphère à 37°C et 10% de CO₂. Le milieu de culture utilisé était du milieu complet DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen) supplémenté avec 20% de sérum de veau foetal (PAA) décomplémenté, 1% d'acides aminés non essentiels (Invitrogen) et 1% d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine, Invitrogen). Une fois les cellules arrivées à 80-90% de confluence, elles ont été récupérées pour être cultivées en système Transwell (**figure 20**). Ce type de système consiste en un filtre microporeux (Ø 24 mm, surface 4,67 cm², membrane de polyester, pore 0,4 µm, Corning) surmonté par un milieu apical et baignant dans un milieu basal. Les cellules ont étéensemencées à 6 x 10⁴ cellules par cm² (Transwell) et incubées avec 1,5 mL de milieu complet DMEM en apical et 2 mL en basal ; elles se multiplient ainsi jusqu'à confluence pendant la première semaine. Elles sont ensuite cultivées pendant 15 jours avec du milieu DMEM complet uniquement en basal, les milieux apicaux et basaux étant changés tous les deux jours jusqu'à leur totale différenciation (soit 21 jours après leur ensemencement en Transwell). La résistance électrique trans-épithélial (TEER) a justement été mesurée tous les deux jours avant le changement de milieu, ainsi que le jour de l'incubation des milieux de lipolyse, avant et après traitement.

Avant chaque expérience d'incubation, les cellules ont été mises à jeun pendant 24 h avec du milieu DMEM sans sérum dans les deux compartiments. Le jour de l'expérience, les cellules ont été incubées avec les milieux de lipolyse (**figure 20**), dilués au 1/20 dans du

milieu sans sérum (dilution ayant été déterminée comme satisfaisante sans induction de toxicité). En parallèle, des incubations avec des micelles mixtes dites « modèles » ont été réalisées (**figure 20**). Ces micelles ont été formulées à base d'acide oléique, d'après les données courantes de la littérature (Salvini et al. 2002 ; Tsuzuki 2007). Les milieux basolatéraux ont été collectés après incubation de 4, 8 et 12 h et stockés à -80°C pour l'analyse des lipides. Au bout des mêmes temps d'incubation, les lysats cellulaires sont récupérés dans du TRI Reagent® après rinçage au PBS, et stockés immédiatement au -80°C en attendant les analyses génomiques.

2.2.4. *Analyses lipidiques*

Les matières premières (huiles) ont été caractérisées en termes de composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.

Les lipides totaux des milieux de lipolyse et des milieux de culture cellulaire basolatéraux ont été extraits par la méthode classique de Folch (Folch *et al.* 1957).

Les produits de lipolyse (triglycérides et phospholipides résiduels, diglycérides monoglycérides, acides gras libres, et lysophospholipides) générés au cours du temps ont été quantifiés par chromatographie sur couche mince couplée à la détection par ionisation de flamme (TLC-FID, Iatroscan).

2.2.5. *Analyses granulométriques*

Après la réalisation des émulsions, les gouttelettes lipidiques ont été observées en utilisant un microscope à contraste de phase. Leur distribution de taille a été analysée par granulométrie à diffusion statique de la lumière à l'aide d'un appareil Coulter LS 230. Les indices de réfraction utilisés pour l'eau (dispersant), l'oléine et l'huile de colza étaient 1,33, 1,46 et 1,47 respectivement. Le diamètre moyen volumique d_{43} et la surface spécifique des gouttelettes lipidiques ont été calculés à l'aide du logiciel fourni avec le granulomètre.

Les lipoprotéines sécrétées en milieu basal par les cellules Caco-2 après incubation avec les milieux de lipolyse ont été concentrées par centrifugation à 13 000 rpm pendant 4 heures à 10°C. Les surnageants récupérés ont été analysés par granulométrie à diffusion dynamique de la lumière (Zetasizer NanoS, § 1.2 Méthodes, granulométrie) à 37°C ; la viscosité et l'indice de réfraction du milieu de culture DMEM à 37°C utilisés étaient respectivement 0,84 cP et 1,445.

Tableau 10. Organisation des différents dosages et expériences dans le cadre des protocoles cliniques et *in vitro*

	Effectué moi-même	Dosages à Lyon sous mon encadrement	Dosages en collaboration interne/externe	Mises au point par moi-même
Protocoles cliniques				
Caractérisation de la matière grasse test et préparation des petits-déjeuners	x (et par GxABT, Liège)			x
Aliquotage plasma	x (plasma apyrogène)		Plasma non apyrogène par infirmières du CRNH	
Calorimétrie indirecte			Par infirmières du CRNH	
Dosages biochimiques lipides & hormones			x (CBS Lyon Sud)	
Dosages ELISA		LBP, CD14, IL-6	NF-κB (UNH, Clermont-Ferrand) ApoB48 (UMR NORT, Marseille)	x
Ultracentrifugations et récupération chylomicrons	x			
Analyses granulométriques	x			x
Analyses isotopiques sur plasmas, CO ₂ et selles			Par plateforme analytique du CRNH	
Mesures d'endotoxines sur plasmas et chylomicrons		x		
Extractions ARN du sang & qPCR	En partie		Poursuite par plateforme génomique du laboratoire	
Extraction des globules blancs	x			
Etude complémentaire <i>in vitro</i>				
Formulation émulsions alimentaires			Par laboratoire TREFLE (Bordeaux)	
Lipolyse des émulsions & analyse			Par laboratoire EIPL (Marseille)	
Culture cellulaire Caco-2 & granulométrie & qPCR	x		qPCR par plateforme génomique du laboratoire	x

Le traitement et les analyses de l'ensemble des données ont été réalisés par moi-même

2.2.6. Analyses génomiques par RT-qPCR

Les différentes étapes sont les mêmes que celles décrites précédemment (cf. § 1.3.11.) avec quelques modifications. Brièvement, les ARN totaux ont été extraits des cellules avec le réactif TRI Reagent® puis quantifiés par spectrophotométrie sur Nanodrop (Labtech). La synthèse de brins ADNc a ensuite été réalisée à partir d'1 µg d'ARN totaux dans le MasterCycler (Eppendorf). Les produits de la rétrotranscription ont été dilués au 1/10 avant de subir un traitement à la RNase H pendant 20 minutes à 37°C. Les échantillons d'ADNc ont été dilués au 1/60 ou au 1/20 (selon gènes) avant la quantification par qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) sur RotorGene 6000 (Corbett Research). L'expression des gènes d'intérêt a été normalisée en mesurant l'expression du gène de ménage TBP (TATAA-Box Binding Protein).

Le **tableau 10** synthétise l'organisation des différents dosages et expériences dans le cadre des protocoles cliniques, Lipinflox et Bibop, et de l'étude complémentaire *in vitro*, mettant ainsi en avant l'important travail de collaboration, en interne et avec d'autres équipes de recherche françaises.

CHAPITRE 3 – MATERIELS ET METHODES

3. ANALYSES STATISTIQUES

Pour chaque paramètre, les résultats ont été présentés sous la forme :

Moyenne \pm erreur standard à la moyenne (ESM)

Nous avons utilisé le logiciel StatView 5.0 (Abacus Concept, Berkeley, Etats-Unis) pour effectuer l'ensemble des tests statistiques. Des différences significatives ont été considérées pour une valeur de P inférieure à 0,05. Dans le cadre des études cliniques, chaque sujet a été son propre contrôle.

3.1. Etude Lipinflox

Données concernant le métabolisme lipidique

La normalité des données a été vérifiée pour l'ensemble des paramètres étudiés (test d'égalité des variances).

Les différences entre les groupes à l'inclusion pour les paramètres anthropométriques et biologiques ont été déterminées en utilisant un test t de Student pour séries non appariées.

Pour les réponses postprandiales, une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs pour mesures répétées a été effectuée pour tester l'effet du temps (cinétique), du repas (tartine 10 g vs 40 g ou tartine vs émulsion) et de l'interaction temps \times repas (différence entre les repas au cours du temps), et ce pour chacun des groupes. En cas d'interaction temps \times repas significative, la différence entre les repas à des temps spécifiques a été analysée à l'aide d'un test t de Student pour séries appariées.

Concernant les ASC et ASC_i, les intra-comparaisons (entre repas pour un même groupe d'IMC) ont été réalisées en utilisant un test t de Student pour séries appariées tandis que les inter-comparaisons (pour un même repas entre les deux groupes de sujets) ont été effectuées par un test t de Student pour séries non appariées.

Les paramètres de cinétique ont été comparés par une analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs selon le type de repas et l'IMC des sujets (effet repas, effet IMC et effet interaction repas \times IMC).

Données concernant les endotoxines

Concernant les valeurs plasmatiques, le test d'égalité des variances a révélé des données non paramétriques. Les différences entre les paramètres de cinétique des différents repas, pour chaque groupe de sujets, ont été analysées à l'aide d'un test de Wilcoxon. De même, pour

chaque groupe, les différences entre les repas à des temps spécifiques de cinétiques et entre les ASCi ont été analysées à l'aide d'un test de Wilcoxon. Un test Z de corrélation a été réalisé entre les données d'endotoxémie plasmatique et les TG de la fraction riche en chylomicrons.

Au sujet des données d'endotoxémie sur la fraction riche en chylomicrons, le test d'égalité des variances a permis de montrer la normalité de ces données et donc l'utilisation de tests statistiques paramétriques. Les différentes analyses ont été effectuées sur quatre temps postprandiaux (60-180-240-300 min). Une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs pour mesures répétées a donc été effectuée pour tester l'effet du temps (cinétique), du repas (tartine 10 g *vs* 40 g ou tartine *vs* émulsion) et de l'interaction temps \times repas (différence entre les repas au cours du temps), et ce pour chacun des groupes de sujets. De plus, la différence entre les repas à des temps spécifiques ou la différence pour un même repas entre différents temps de cinétique ont été analysées à l'aide de tests t de Student pour séries appariées.

3.2. Etude Bibop

La normalité des données a été vérifiée pour l'ensemble des paramètres anthropométriques et lipidiques étudiés (test d'égalité des variances) chez cette population. En revanche, les données d'endotoxémie plasmatique ne suivant pas une loi normale (comme dans le cas du protocole Lipinflox), des tests statistiques non paramétriques ont été utilisés pour l'analyse de ces données.

Les différences entre les paramètres anthropométriques et biologiques, avant et après l'opération de by-pass gastrique, ont été déterminées en utilisant un test t de Student pour séries appariées.

Les endotoxémies plasmatiques ainsi que les paramètres associés (C_{\max} et ASCi) ont été comparés avant et après by-pass gastrique par des tests de Wilcoxon.

Les comparaisons des paramètres inflammatoires (IL-6, LBP, sCD14) avant et après by-pass ou avec les autres sujets Lipinflox ont été réalisées par des tests t de Student pour séries appariées et non appariées, respectivement. Une corrélation entre concentrations à jeun en LBP et IL-6 plasmatiques a été effectuée à l'aide d'un test Z de corrélation.

3.3. Etude complémentaire *in vitro*

Des analyses de variance (ANOVA) multivariées suivies de tests post-hoc PLSD de Fisher ont été réalisées afin de comparer les résultats selon le type de traitement (nature de l'huile, nature de l'émulsifiant, phase gastrique *vs* pancréatique) et le temps d'incubation. Les comparaisons entre émulsions à des temps spécifiques ont été effectuées, soit par ANOVA simple, soit par un test *t* de Student.

CHAPITRE 4 – RESULTATS

1. MODULATION DU METABOLISME LIPIDIQUE PAR LA STRUCTURE EMULSIONNEE OU NON DE LA MATIERE GRASSE

1.1. Evaluation des différences de métabolisme postprandial des lipides non émulsionnés entre des sujets obèses et normo-pondérés (étude Lipinflox)

1.1.1. Introduction

Les obèses se caractérisent par un métabolisme lipidique altéré par rapport à celui de sujets normo-pondérés. L'obésité s'accompagne, en effet, d'anomalies de l'utilisation des graisses comme substrat énergétique (Schutz *et al.* 1989), telles qu'une diminution de la capacité du muscle à oxyder les AGNE en situation postprandiale (Kalant *et al.* 2000 ; Giacco *et al.* 2004) associée à une distribution des lipides alimentaires favorisant leur stockage (Binnert *et al.* 1998, Bessesen *et al.* 1995). Nous avons ainsi choisi d'étudier des sujets normo-pondérés et obèses, différents sur le plan métabolique. A notre connaissance, la réponse postprandiale à différentes quantités de matière grasse chez l'obèse n'a encore jamais été décrite de manière exhaustive. De plus, les tests de digestion relatés dans la littérature impliquent très souvent l'utilisation de quantités très élevées de matière grasse (> 50 g voire 1g MG/kg poids corporel). C'est pourquoi nous avons voulu évaluer, à la fois chez des normo-pondérés et chez des obèses, les effets métaboliques de la digestion de deux quantités de matière grasse, l'une représentative de la contribution moyenne des lipides du petit déjeuner conseillés dans les apports journaliers (10 g), l'autre plus élevée (40 g) et connue pour induire une réponse lipidique postprandiale significative (Lairon *et al.* 2008), tout en restant physiologique.

Tout au long des 8 heures de digestion, nous avons évalué des paramètres métaboliques et hormonaux tels que les concentrations plasmatiques en glucose, insuline, acides gras non estérifiés et triglycérides des chylomicrons. L'oxydation lipidique totale a été déterminée par calorimétrie indirecte ; ces résultats couplés à ceux obtenus par la mesure de l'enrichissement en ¹³C du CO₂ expiré (breath test) nous ont permis de calculer la part des lipides exogènes (triglycérides marqués au carbone 13) oxydés. Enfin, la perte fécale en lipides marqués ingérés a également été mesurée.

Tableau 11. Paramètres anthropométriques et métaboliques des sujets normo-pondérés et obèses à jeun (protocole Lipinflox)

	Normaux-pondérés (n=9)	Obèses (n=9)	<i>P</i>
Paramètres anthropométriques			
Age (années)	28 ± 1	30 ± 2	<i>ns</i>
Poids corporel (kg)	72,0 ± 2,1	101,2 ± 1,9	< 0,0001
IMC (kg/m ²)	22,3 ± 0,5	31,7 ± 0,3	< 0,0001
Tour de taille (cm)	83,3 ± 1,6	105,9 ± 0,8	< 0,0001
Paramètres métaboliques à jeun			
Glucose (mM)	4,94 ± 0,16	5,19 ± 0,15	<i>ns</i>
Insuline (mUI/L)	3,75 ± 0,59	7,14 ± 0,95	0,008
HOMA	0,85 ± 0,14	1,69 ± 0,25	0,009
Cholestérol total (mM)	4,85 ± 0,22	4,89 ± 0,24	<i>ns</i>
Cholestérol HDL (mM)	1,51 ± 0,10	1,09 ± 0,06	0,004
Cholestérol LDL (mM)	3,03 ± 0,27	3,11 ± 0,21	<i>ns</i>
Triglycérides (mM)	0,85 ± 0,06	1,39 ± 0,18	0,017

IMC : indice de masse corporelle ; HDL : high density lipoproteins ; HOMA : homeostasis model assessment ;
ns : non significatif ; VLDL : very low density lipoproteins

Les données présentées sont des moyennes ± SEM.

Valeurs de *P* obtenues par tests *t* de Student non appariés.

1.1.2. Caractéristiques des sujets et des repas tests

Paramètres anthropométriques et métaboliques des sujets à jeun

Les paramètres anthropométriques et métaboliques des sujets étudiés dans le protocole Lipinflox sont présentés dans le **tableau 11**. L'ensemble des sujets étudiés présentent une moyenne d'âge de 29 ans. Les sujets normo-pondérés ont un IMC compris entre 20 et 25 kg/m² tandis que les sujets obèses ont un IMC supérieur, compris entre 30 et 35 kg/m², ainsi qu'un tour de taille supérieur à 94 cm. Les paramètres métaboliques à jeun confirment que ces sujets ne présentent pas de désordres métaboliques comme un diabète ou des problèmes de dyslipidémie. Comme attendu, les sujets obèses présentent néanmoins des valeurs basales de triglycéridémie et d'indice HOMA (homeostasis model assessment of insulin resistance) supérieures à celles des sujets normo-pondérés.

Composition macro-nutritionnelle des petits-déjeuners 10 g vs 40 g de matière grasse tartinée

La composition nutritionnelle des 2 petits-déjeuners (10 g et 40 g de matière grasse tartinée) est présentée dans le **tableau 12**. Ils sont isoprotéiques et isoglucidiques ; seule la teneur en lipides varie (11,4 g vs 41,4 g au total). La matière grasse (laitière) apporte 68,6% d'AGS, 28,1% d'AGMI et 3,3% d'AGPI. Un même mélange de triglycérides marqués au carbone 13 a été ajouté aux différentes quantités de matière grasse (90 mg de ¹³C-trioctanoïne, 210 mg de ¹³C-trioéline et 300 mg de ¹³C-tripalmitine). Le petit-déjeuner à base de 10 g de matière grasse apporte en moyenne 282 kcal contre 552 kcal apportées par celui à base de 40 g de matière grasse. La composition du second repas servi au bout de 5h est présenté en 5.1.3.

1.1.3. Résultats

Triglycérides et taille de la fraction riche en chylomicrons

La **figure 21** (A-B) montre, pour chaque groupe, les cinétiques d'augmentation de TG de la fraction riche en chylomicrons (Δ TG FRCM) en réponse à la digestion de 10 g et de 40 g de matière grasse tartinée. On observe une augmentation significative de la lipémie au cours du temps ($P_{\text{temps}} < 0,0001$) et des différences de lipémie selon le repas ($P_{\text{repas}} = 0,002$ et $P_{\text{temps} \times \text{repas}} < 0,0001$), dans les deux groupes. La digestion de 40 g de MG induit, comme attendu, une lipémie plus importante comparée aux 10 g, et ce dans les deux groupes de sujets

Tableau 12. Composition macro-nutritionnelle des petits-déjeuners tests à base de 10 g ou 40 g de matière grasse tartinée (protocole Lipinflox)

Composition des petits-déjeuners 10 g vs 40 g tartinés				
	Quantité (g ou mL)	Glucides (g)	Protéines (g)	Lipides (g)
Matière grasse laitière				
anhydre *	10	-	-	10
Lait écrémé **	160	7,5	5,3	0,3
Pain	50	28	4	0,5
[1,1,1- ¹³ C ₃] trioctanoïne	0,09	-	-	0,09
[1,1,1- ¹³ C ₃] tripalmitine	0,30	-	-	0,30
[1,1,1- ¹³ C ₃] trioléine	0,21	-	-	0,21
Total (g)	220,6	35,5	9,3	11,4
Energie (kcal)	281,8	142	37,2	102,6
% de l'énergie		51	13	36
Matière grasse laitière				
anhydre *	40	-	-	40
Lait écrémé **	160	7,5	5,3	0,3
Pain	50	28	4	0,5
[1,1,1- ¹³ C ₃] trioctanoïne	0,09	-	-	0,09
[1,1,1- ¹³ C ₃] tripalmitine	0,30	-	-	0,30
[1,1,1- ¹³ C ₃] trioléine	0,21	-	-	0,21
Total (g)	250,6	35,5	9,3	41,4
Energie (kcal)	551,8	142	37,2	372,6
% de l'énergie		26	7	67

* Profil en acides gras des triglycérides inclut 68,6% d'acides gras saturés, 28,1% d'acides gras monoinsaturés et 3,3% d'acides gras polyinsaturés.

** Aromatisé à la vanille.

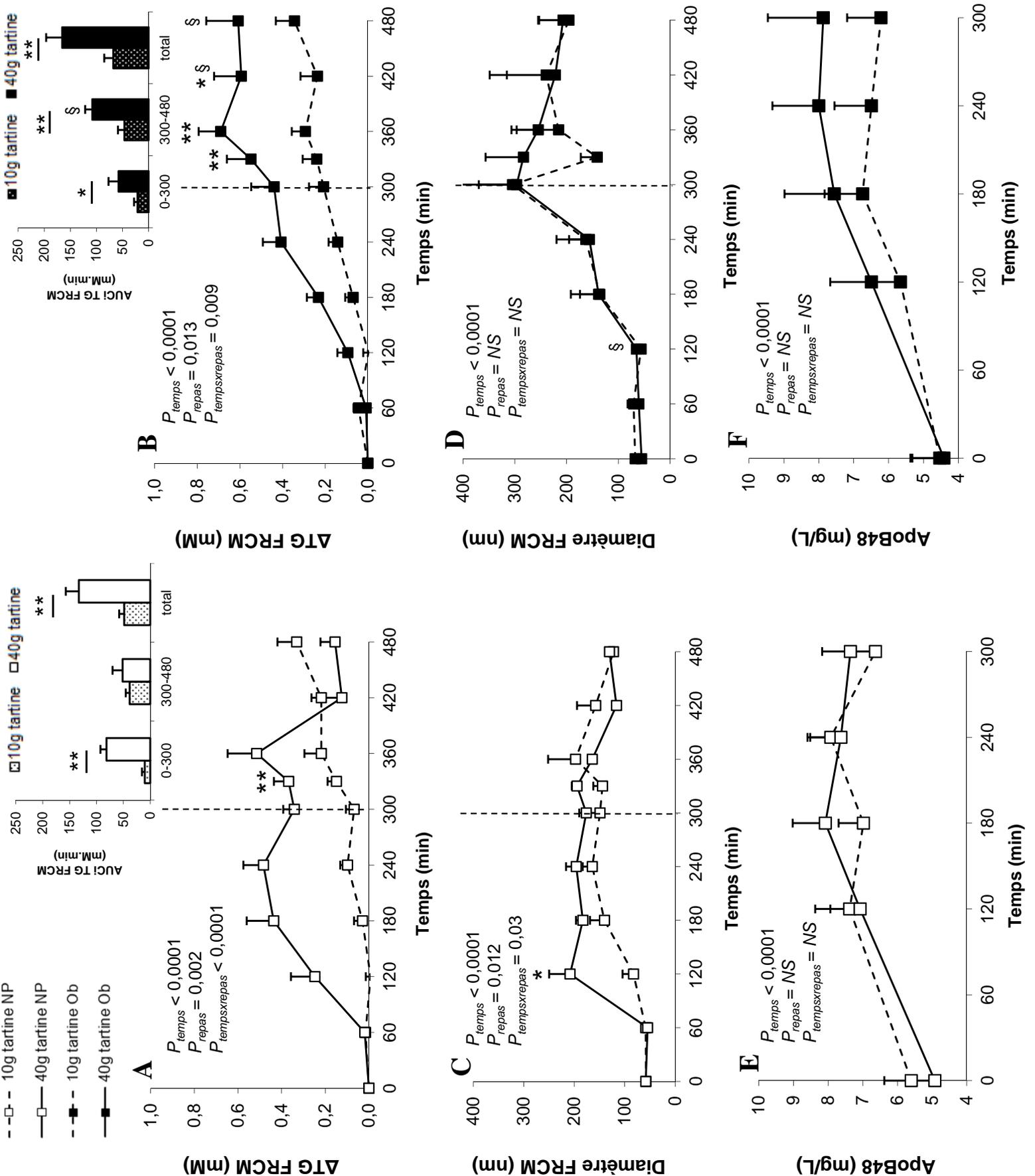


Figure 21. Cinétiques postprandiales après consommation de 10 g (lignes pointillées) ou 40 g (lignes pleines) de matière grasse : delta TG FRCM (mM) chez les normo-pondérés (A) et chez les obèses (B), et AUCi correspondantes en insert ; taille des FRCM (nm) chez les normo-pondérés (C) et chez les obèses (D) ; ApoB48 (mg/M) chez les normo-pondérés (E) et chez les obèses (F). Les données présentées sont des moyennes \pm SEM, n=9 par groupe. P_{temps} , P_{repas} et $P_{temps \times repas}$ pour périodes postprandiales de 0 à 300 min (ANOVA mesures répétées suivies d'un test post-hoc PLSD de Fisher). * $P < 0,05$ et ** $P < 0,01$ 10g vs 40g, pour les temps considérés (tests t de Student appariés) ; § $P < 0,05$ AUCi et delta TG FRCM (pour les temps considérés) obèses vs normo-pondérés, (tests t de Student non appariés).

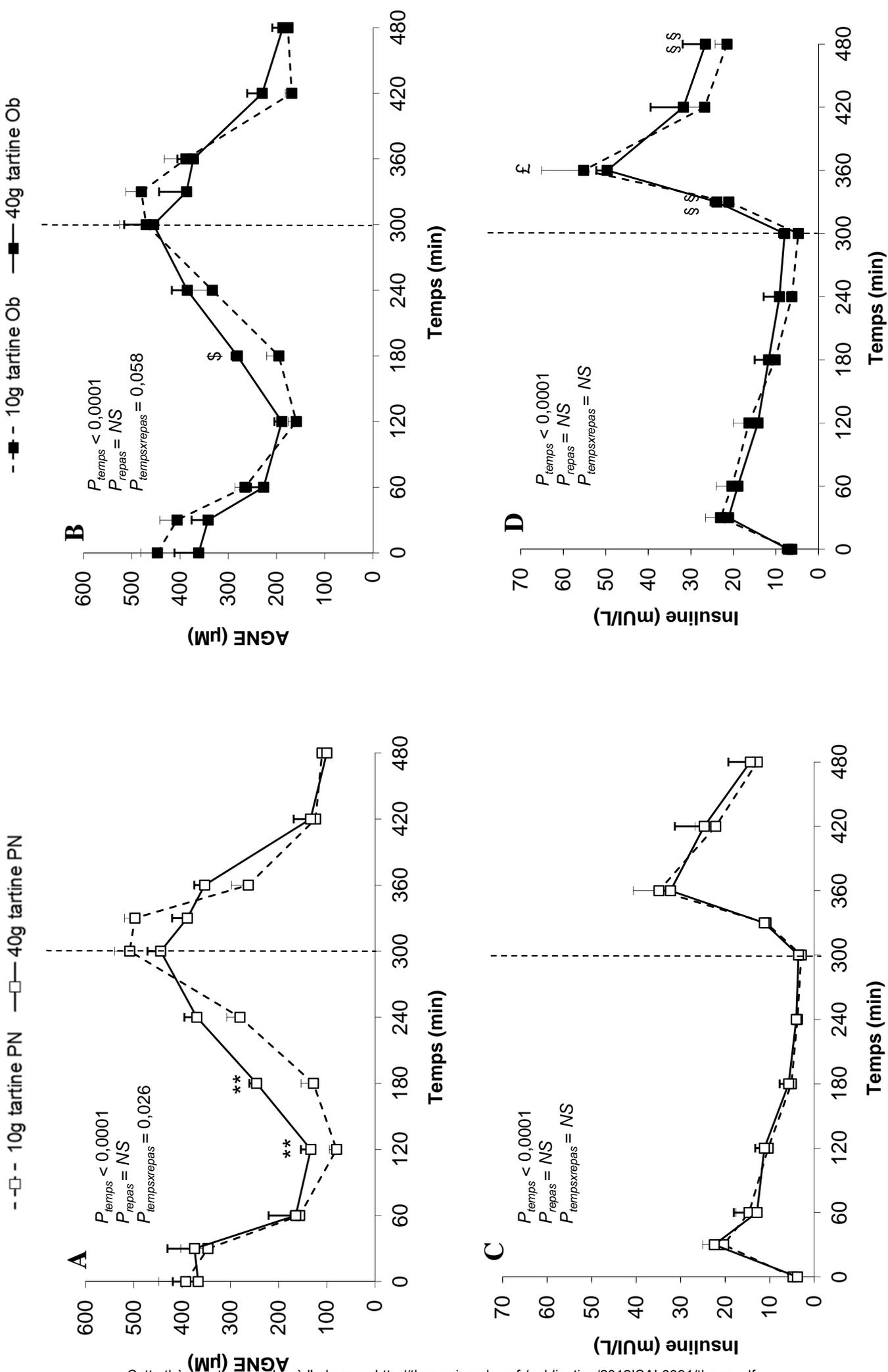


Figure 22. Cinétiques postprandiales après consommation de 10 g (lignes pointillées) ou 40 g (lignes pleines) de matière grasse : AGNE (μM) chez les normo-pondérés (A) et chez les obèses (B) ; insuline (mU/L) chez les normo-pondérés (C) et chez les obèses (D). Les données présentées sont des moyennes \pm SEM, $n=9$ par groupe. P_{temps} , P_{repas} et $P_{\text{tempsxrepas}}$ pour périodes postprandiales de 0 à 300 min (ANOVA mesures répétées suivies d'un test post-hoc PLSD de Fisher). (B) $** P < 0,01$ et $\$ P < 0,1$ pour les temps correspondants 10g vs 40g (tests t de Student appariés) ; (D) $\$ P < 0,01$ et $\$§ P < 0,01$ et $\$ P < 0,1$ obèses vs normo-pondérés, concernant 10 g et 40g, pour les temps considérés (tests t de Student non appariés).

($P_{\text{repas}} < 0,0001$). Suite à la tartine de 10 g, les cinétiques de ΔTG sont similaires entre les deux groupes ; notons cependant l'amorce d'une diminution du ΔTG à 300 min chez les normo-pondérés, non visible chez les obèses (constante augmentation du ΔTG au cours du temps). En revanche, celles concernant les 40 g de matière grasse tartinée présentent des différences notables entre normo-pondérés et obèses. On observe, en effet, chez les obèses un retard d'augmentation de la lipémie lors de la digestion des 40 g, celle-ci ne commençant à réellement s'élever qu'au bout de 180-240 min. Par ailleurs, si la lipémie est retardée chez les obèses durant les 5 premières heures, celle-ci se maintient élevée le reste de la journée test et se cumule à la lipémie engendrée par le second repas. Ceci n'est pas observé chez les minces, chez qui l'on constate une première élévation de la lipémie au cours de la matinée puis une seconde juste après le second repas, pour revenir à des valeurs basales en fin de test. Au total (0-480 min) ainsi que sur les cinq premières heures (0-300 min), pour chaque groupe, les ASCi sont supérieures suite à 40 g de MG, comparé à 10 g ($P < 0,01$), mais ne sont pas différentes entre normo-pondérés et obèses. Si l'on s'intéresse spécifiquement à la période postprandiale post-déjeuner (300-480 min), on note aucune différence d'ASCi pour les normo-pondérés (40 g vs 10 g) mais, pour les obèses, suite à 40g de MG ingérée, on relève une ASCi nettement supérieure suite à celle obtenue après 10 g de MG ($P < 0,01$) et supérieure à celle observée pour les normo-pondérés ($P < 0,05$). En fin de test, aux temps 420 et 480 minutes, les concentrations en TG de la FRCM observées chez les obèses sont d'ailleurs significativement supérieures à celles obtenues aux mêmes temps pour les normo-pondérés ($P < 0,05$).

Parallèlement à leur augmentation de teneur en TG, la taille des particules de la fraction riche en chylomicrons augmente au cours du temps de digestion ($P_{\text{temps}} < 0,0001$) dans les deux groupes (**figure 21 C-D**). Chez les normo-pondérés, la taille des particules sécrétées est différente selon le repas ingéré le matin et augmente rapidement, dès 120 min ($P < 0,05$), avec une production de plus gros chylomicrons suite à 40 g de MG. En revanche, les obèses sécrètent tout au long du test des particules de taille identique, qu'ils aient ingéré 10 g ou 40 g de matière grasse au petit-déjeuner. On constate notamment qu'au bout de 120 minutes de digestion de 40 g de matière grasse, la taille des particules de la FRCM observée chez les obèses est significativement inférieure à celle obtenue pour les normo-pondérés ($65 \pm 8 \text{ nm}$ vs $208 \pm 41 \text{ nm}$, $P < 0,05$).

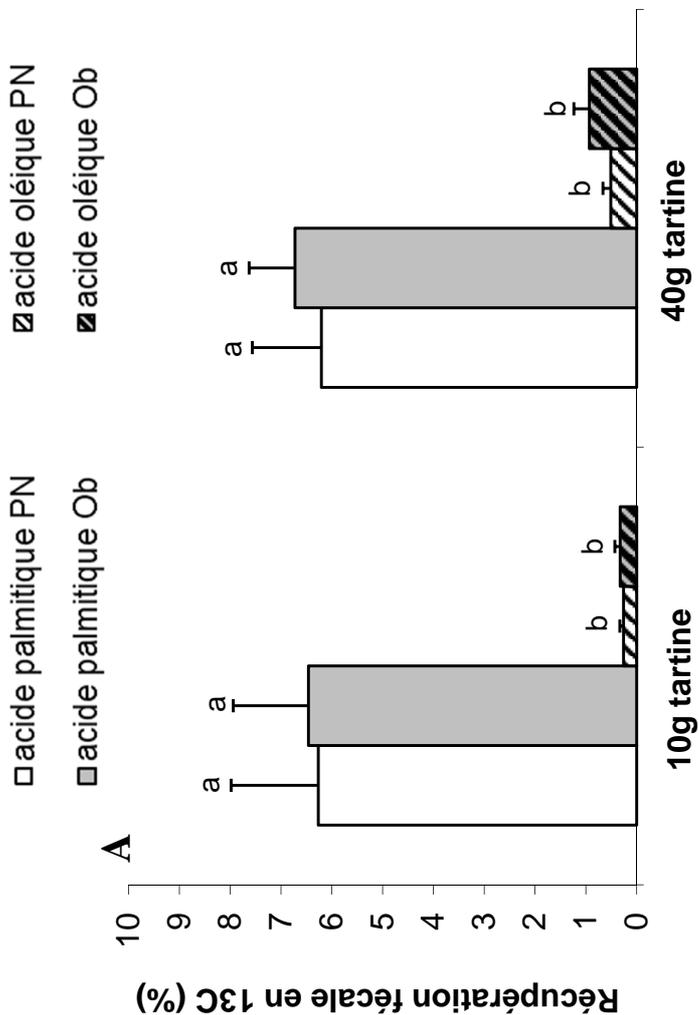
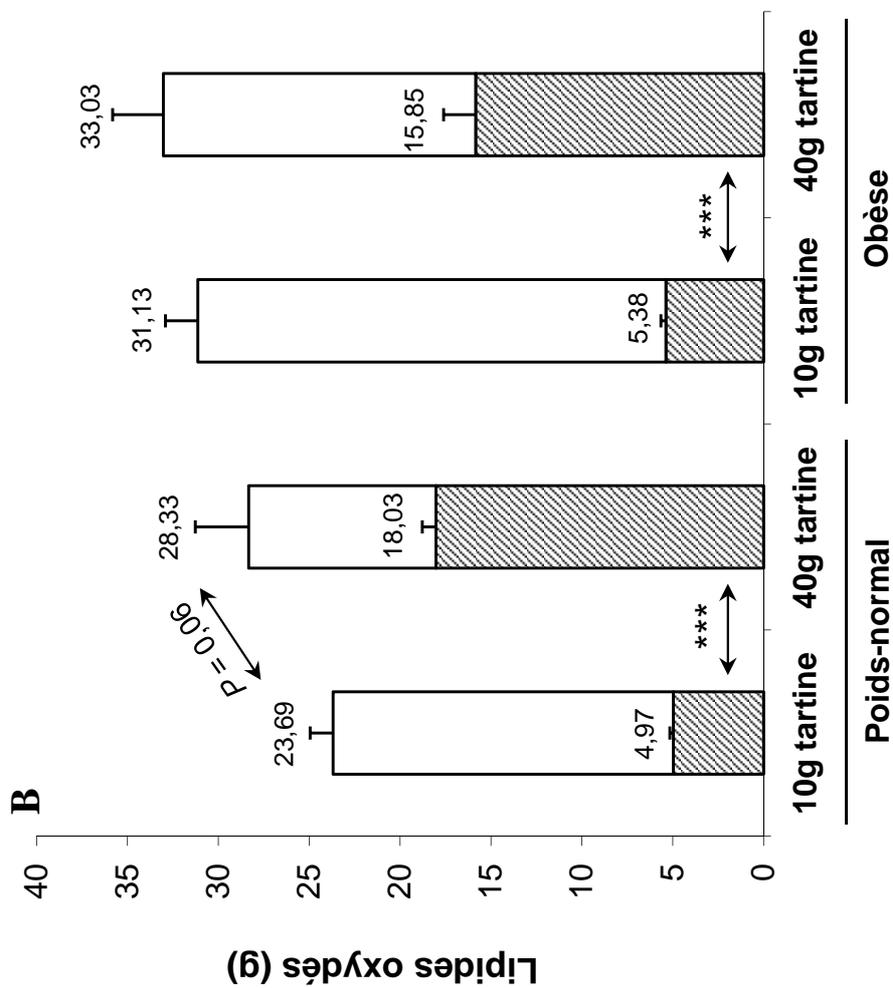


Figure 23. Pertes fécales en ^{13}C -acide palmitique (barres pleines) et ^{13}C -acide oléique (barres rayées) après consommation de 10 g ou 40 g de matière grasse tartinée chez les normo-pondérés (blanc) et chez les obèses (gris) (A) ; parts respectives des lipides exogènes et totaux oxydés suite à 10 g ou 40 g de matière grasse tartinée, pour les deux groupes de sujets (B). Les données présentées sont des moyennes \pm SEM, $n=9$ par groupe. (A) Aucune lettre commune indique une différence significative ($P < 0,05$) ; (B) $P < 0,01$ 10g vs 40g (tests t de Student appariés).

ApoB-48 plasmatique

Les cinétiques d'ApoB48 ont été étudiées sur la première période postprandiale (0-300 min) et sont présentées en **figure 21** (E-F). On observe une augmentation des concentrations au cours du temps dans les deux groupes ($P_{\text{temps}} < 0,0001$) mais il n'apparaît pas de différences significatives selon la quantité de MG ingérée, bien qu'une tendance à une augmentation supérieure soit observée chez les obèses.

Acides gras non estérifiés et insuline plasmatiques

Les cinétiques plasmatiques des AGNE et de l'insuline sont présentées en **figure 22** (A-B-C-D). On observe pour ces deux paramètres un changement significatif au cours du temps, dans les deux groupes ($P_{\text{temps}} < 0,0001$). Concernant les AGNE, la diminution observée au bout de 120 min et 180 min est significativement plus faible, chez les normo-pondérés, suite aux 40 g comparé aux 10 g de MG ($P < 0,01$). Ce phénomène a tendance à se retrouver chez les obèses au bout de 180 min ($P < 0,1$). Concernant la sécrétion d'insuline, les cinétiques sont similaires suite à la digestion de 10 g et de 40 g de MG, dans chaque groupe. Il faut néanmoins noter, après le second repas, des concentrations plasmatiques d'insuline supérieures chez les obèses, comparé aux normo-pondérés, et ce indépendamment du petit-déjeuner ingéré ($P < 0,01$).

Pertes fécales et oxydation lipidique

Les pertes fécales en ^{13}C -acide palmitique et ^{13}C -acide oléique sont présentées en **figure 23** (A). L'acide palmitique s'avère davantage perdu dans les selles que l'acide oléique, aussi bien chez les normo-pondérés que chez les obèses ($P < 0,05$). L'augmentation de la quantité de MG ingérée n'induit pas de perte fécale plus importante.

Par ailleurs, l'oxydation lipidique totale a tendance à augmenter avec la quantité ingérée chez les normo-pondérés ($P = 0,06$) tandis qu'elle ne change pas chez les obèses (**figure 23** (B)). Concernant la part des lipides exogènes oxydés, celle-ci est très significativement augmentée lors d'un apport initial en matière grasse plus élevé (40 g vs 10 g, $P < 0,001$), et ce dans les deux groupes. Les obèses, tout comme les normo-pondérés, oxydent environ 40 à 50 % des lipides exogènes ingérés, lors de chaque repas.

1.1.4. Discussion

Deux quantités différentes de matière grasse apportées sous la même structure, c'est-à-dire une phase continue de MG tartinée, ont été testées chez des sujets normo-pondérés et obèses. Si les cinétiques d'apparition des chylomicrons en réponse aux 10 g de matière grasse tartinée sont similaires entre les groupes de sujets, celles concernant la digestion des 40 g s'avèrent très différentes selon l'IMC des sujets considérés. En effet, un réel retard d'apparition des chylomicrons dans la circulation sanguine a été observé chez les obèses, durant les premières heures de digestion. Certainement en raison de ce retard, la lipémie engendrée après le second repas est exacerbée, atteignant une valeur maximale à 360 min puis demeurant élevée jusqu'à 480 min, phénomène non observé chez les normo-pondérés. L'absorption des 40g de matière grasse tartinée apparaît ainsi retardée pour les sujets obèses dans un premier temps, entraînant une lipémie exacerbée sur le reste de la journée que l'on peut interpréter comme traduisant une difficulté d'adaptation à une quantité accrue de matière grasse ingérée.

De plus, nous avons constaté la sécrétion rapide de plus gros chylomicrons chez les sujets normo-pondérés, notamment au bout de 120 min. Or, de telles particules sont connues pour être mieux lipolysées par la LPL comparées à celles de plus petite taille (Xiang *et al.* 1999). Ainsi, nous pouvons également suggérer que les normo-pondérés présenteraient de meilleures capacités de clairance, ce qui faciliterait un retour à la normale de la lipémie tandis que les sujets obèses auraient une accumulation de particules riches en TG (chylomicrons et remnants), certainement en raison d'une mauvaise clairance. Il a en effet été décrit, chez des sujets présentant une adiposité viscérale excessive, une altération de la clairance postprandiale des lipoprotéines riches en TG (Couillard *et al.* 1998). De plus, une augmentation de lipémie peut s'expliquer aussi par deux phénomènes, co-existants ou non, impliquant les caractéristiques des chylomicrons. En effet, l'augmentation de la taille des chylomicrons (particules alors plus riches en TG) et/ou celle du nombre de chylomicrons (plus d'ApoB48) sont de nature à élever la lipémie postprandiale (cf. Chap.1, § 4.1.2). Nous avons montré chez les normo-pondérés un effet de la quantité en MG ingérée, accompagné d'une interaction « temps x repas » quant à la taille des particules riches en TG sécrétées en phase postprandiale. La digestion de 40 g de MG induirait ainsi, chez les sujets de poids normal, des chylomicrons de plus grande taille comparé à 10 g, phénomène cohérent avec la lipémie plus élevée observée avec 40 g (*vs* 10 g). Les sujets obèses présentent tout au long de la journée des particules de même taille que ce soit après 10 g ou 40 g de matière grasse tartinée ; or,

leur lipémie est significativement supérieure suite aux 40 g (*vs* 10g). Nous pensons donc que les sujets obèses doivent présenter un plus grand nombre de « petits » chylomicrons suite à la consommation de 40 g de MG par rapport à 10 g, cela pouvant être lié à une différence de sécrétion et/ou de clairance. On peut d'ailleurs deviner une certaine augmentation des concentrations en ApoB48 plasmatique chez l'obèse avec l'augmentation de la quantité de matière grasse ingérée, bien que le nombre de sujets étudiés ne soit pas assez important pour observer des différences significatives.

Nous devons également noter que les sujets ayant une lipémie à jeun élevée présentent généralement une lipémie postprandiale exacerbée (Mekki *et al.* 1999). Les sujets obèses recrutés dans notre protocole ne présentent pas d'hypertriglycéridémie à jeun (car TG < 1,7 mM, soit < 1,5 g/L, seuil d'hypertriglycéridémie) mais leur taux de TG est supérieur à celui des sujets de poids normal. Le phénomène d'exacerbation n'est pas observé ici chez les sujets obèses lors de la digestion du petit-déjeuner au cours des cinq premières heures puisque même avec 40 g de matière grasse ingérée, il est difficile d'obtenir pour ces sujets une augmentation significative rapide de la lipémie. En revanche, nous avons observé chez les obèses une certaine exacerbation de la lipémie après le 2nd repas qui pourrait être liée à leur lipémie à jeun élevée ; cependant, ce phénomène n'a pas lieu avec une faible quantité de MG puisqu'avec le repas test à 10 g, la lipémie postprandiale des sujets obèses est très similaire à celle obtenue pour les normo-pondérés. Néanmoins, il faut rappeler que les phénomènes venant d'être décrits sont intimement liés puisqu'une mauvaise clairance des LRT peut directement impliquer une lipémie élevée à jeun.

Par ailleurs, le stockage entérocytaire interprandial de TG pourrait participer à l'exacerbation de la lipémie, d'autant plus importante au fur et à mesure des repas pris au cours de la journée. Nous avons vu dans le sous-chapitre bibliographique 3.2.3 (Chap. 1) que les entérocytes sont capables de former des réserves de TG servant à la synthèse de néo-chylomicrons sécrétés avant même que la digestion et l'absorption des lipides d'un repas suivant n'aient eu le temps de commencer. A notre connaissance, un stockage entérocytaire plus ou moins important selon l'IMC des sujets n'a pas encore été décrit. Cependant, dans le cas de sujets insulino-résistants, et donc parfois obèses, une lipogenèse *de novo* accrue accompagnée d'une sécrétion de plus grandes quantités de chylomicrons ont été mises en avant récemment dans les cellules entérocytaires (Hsieh *et al.* 2008; Hayashi *et al.* 2011). Comparés aux sujets normo-pondérés, les sujets obèses de notre étude présentent naturellement une insulïnémie et un HOMA à jeun supérieurs. Ils ne sont cependant pas

insulino-résistants ni diabétiques comme leurs valeurs à jeun en glucose, insuline et HOMA en témoignent (**tableau 11**), même si leur adiposité viscérale et une légère augmentation de leurs paramètres métaboliques à jeun sont des facteurs de risque et les prédisposent à des désordres métaboliques futurs.

Parallèlement à l'insulinémie, l'évolution des AGNE plasmatiques a été suivie tout au long de la journée test. Leur diminution postprandiale est connue pour être engendrée par l'effet inhibiteur de l'insuline sur la lipolyse adipocytaire. Cette diminution a été constatée moins élevée suite aux 40 g par comparaison aux 10 g de MG. Les normo-pondérés n'ayant eu aucune difficulté à absorber les 40 g de MG tartinée, les chylomicrons ont été lipolysés au fur et à mesure par la LPL et ont ainsi généré une quantité importante d'AGNE, non captés tout de suite par les tissus, se retrouvant ainsi dans la circulation sanguine. Ce phénomène s'appelle le spillover et nous pensons qu'il est à l'origine des concentrations élevées en AGNE observées. Cette observation est cohérente avec l'absence d'augmentation des AGNE suite aux 10 g et avec la simple tendance d'augmentation observée chez les obèses, qui présentent justement, à ces temps-là, un retard à l'absorption des lipides ingérés.

Enfin, au-delà de la lipémie, nous avons étudié le devenir métabolique des acides gras ingérés le matin. Bien que les lipides soient généralement décrits pour ne pas induire leur propre oxydation (cf. Chap.1, § 4.2.1), nous montrons dans cette étude que l'oxydation lipidique est nettement induite suite à la digestion de 10 g ou 40 g de matière grasse. Nous devons souligner ici le rôle important des acides gras courts et moyens de la matière grasse laitière. De par leur structure moléculaire, ils sont en effet directement absorbés puis beta-oxydés (cf. Chap.1, § 3.2.4.). Leur contribution à l'oxydation lipidique observée est donc certainement importante, que ce soit (i) l'oxydation lipidique totale (intégrant les acides gras de la matière grasse laitière totale ingérée) ou (ii) l'oxydation des lipides exogènes que nous avons calculée sur la base des traceurs lipidiques, dans lesquels nous avons inclus des acides gras à chaîne moyenne à hauteur de leur concentration dans la matière grasse laitière testée. En outre, l'obésité est souvent associée à un défaut d'oxydation des lipides (cf. Chap.1, § 4.2.1). Cependant, les présents résultats montrent l'aptitude des sujets obèses à oxyder les 10 g ou 40 g de matière grasse laitière ingérée, à hauteur de 40 à 50% environ, comme les sujets de poids normal. L'augmentation de la dose ingérée n'altère en rien l'oxydation lipidique totale (33,0 g lipides totaux oxydés suite à 40 g vs 31,1 g lipides totaux oxydés suite à 10 g) chez les sujets normo-pondérés. Par ailleurs, il est important de souligner que de nombreuses études sont réalisées avec un seul type d'acide gras (très souvent du palmitate ou

de l'oléate), n'étant pas extrapolable à tous types de matière grasse ; des bolus d'huile sont aussi couramment donnés aux sujets mais ne reflètent pas un repas mixte, contrairement à notre étude. Enfin, les quantités ingérées étudiées sont parfois peu réalistes : avec un test à 1 g de MG/kg de poids corporel, par exemple, on comprend que, chez des sujets obèses, les quantités de lipides ingérés correspondantes semblent difficilement β -oxydables. Tous ces facteurs concourent donc à introduire un biais ou, pour le moins, une limite non négligeable dans l'extrapolation des résultats obtenus.

Ainsi, au vu de cette première étude, il semblerait qu'une quantité modérée de matière grasse (40 g) ne soit pas métabolisée de la même manière entre sujets normo-pondérés et obèses. Ces derniers démontrent une cinétique de lipémie postprandiale très différente de celle observée pour les sujets normo-pondérés, montrant notamment un retard à la digestion des 40 g de MG. Ce retard entraîne alors une augmentation progressive et continue de la lipémie au cours de la journée, cet effet étant amplifié par la prise d'un second repas et associé probablement à un défaut de clairance chez ce type de sujets. Le maintien d'une lipémie élevée est cependant connu pour ses lourdes conséquences métaboliques, notamment cardiovasculaires. A quantité égale en matière grasse ingérée, existe-t-il alors un moyen d'améliorer la métabolisation des lipides ? Et de moduler, voire diminuer, les risques métaboliques encourus, notamment chez des personnes obèses ?

1.2. Modulation de l'absorption et du devenir métabolique des lipides par la structure émulsionnée (étude Lipinflox)

1.2.1. Introduction

L'absorption intestinale des nutriments et les événements post-absorptifs durant la période postprandiale jouent un rôle majeur dans l'initiation et le développement des maladies métaboliques et cardiovasculaires. Le management du métabolisme postprandial des lipides fait l'objet de nombreuses recherches afin de mieux contrôler le devenir des lipides ingérés. Ainsi, un meilleur contrôle de l'absorption des lipides et de leur répartition postprandiale *via* une clairance efficace de la lipémie, associée à une β -oxydation lipidique importante, est l'un des enjeux à relever actuellement. De nombreuses études ont mis en avant que l'augmentation de la quantité de lipides ingérés exposait l'organisme à des paramètres lipidiques plus élevés ainsi qu'à un stockage des graisses (cf. Chap.1, § 4). Une hypertriglycéridémie prolongée est également associée à un risque cardiovasculaire élevé (Nordestgaard *et al.* 2007; Chapman *et*

al. 2011). Chez l'obèse, nous avons montré un défaut d'adaptation à une quantité accrue mais modérée de MG (40 g), comparée à une quantité plus faible (10 g), notamment pour initier la lipémie postprandiale. De plus, la qualité (profil en AG) des matières grasses alimentaires est de nature à moduler la lipémie postprandiale (Mekki *et al.* 2002), notamment en modifiant la taille des chylomicrons sécrétés qui seront ainsi lipolysés différemment (cf. Chap.1, § 4.1.1.c). Cependant, à quantité et qualité égales de matière grasse, la modulation à la fois de la lipémie mais aussi du devenir des lipides ingérés reste encore à explorer.

Dans tout régime alimentaire, les lipides font partie constitutive d'aliments complexes et se retrouvent incorporés sous la forme de structures diverses (cf. Chap.1, § 2.2). Parmi ces structures, ce sont les émulsions qui sont les plus représentées et employées en agro-alimentaire et nutrition clinique. Celles-ci s'avèrent être d'un grand intérêt, notamment sur le plan de la digestion et de l'absorption lipidiques (cf. Chap.1, § 2.2.3). En effet, l'importance de l'émulsification par rapport à une huile « libre » sur la biodisponibilité et la cinétique d'absorption des acides gras a été montrée chez le rongeur et chez l'Homme en utilisant des émulsions modèles (Michalski *et al.* 2005 ; Garaiova *et al.* 2007 ; Keogh *et al.* 2011). Néanmoins, les conséquences de telles différences de cinétiques de digestion d'une matière grasse émulsionnée ou non, dans un repas réaliste, sur le devenir post-absorptif des lipides ingérés reste à explorer chez l'Homme, notamment chez des personnes obèses où le fléchage métabolique des acides gras exogènes est très important.

Nous émettons donc l'hypothèse que la structure supramoléculaire émulsionnée des lipides dans les aliments est de nature à moduler la cinétique de lipémie puis l'orientation métabolique des lipides ingérés (β -oxydation *vs* stockage), à la fois chez des sujets normo-pondérés et obèses. Le but de l'étude, ici, est de montrer les contributions respectives de la structure émulsionnée et de l'IMC des sujets étudiés sur les caractéristiques du métabolisme lipidique postprandial (lipémie/chylomicrons, oxydation/spillover). Pour cela, nous avons exploré la réponse métabolique de 9 sujets normo-pondérés et de 9 sujets obèses, suite à la consommation de 40 g de MG émulsionnée ou non, lors de petits-déjeuners tests. Ces derniers étaient à base de matière grasse laitière anhydre, soit sous forme non émulsionnée (tartinée), soit sous forme d'une fine émulsion (gouttelettes submicroniques recouvertes de protéines lactières). Ainsi, les deux types de produits testés dans ce protocole représentent les niveaux d'émulsification les plus différents de la matière grasse laitière observés en pratique. Le petit-déjeuner à base de 40 g de MG non émulsionnée est le même que celui décrit dans l'étude précédente (cf. Chap.4, § 1.1.2), ayant été comparé aux 10 g de MG tartinée. Cette fois-ci, les

deux petits-déjeuners étudiés sont iso-caloriques et constitués exactement des mêmes ingrédients, seule la structure de la matière grasse diffère entre les deux. Par ailleurs, un mélange de traceurs (triglycérides marqués au ^{13}C) représentatif de la proportion des différents types d'acides gras de la matière grasse laitière testée (acides gras à chaîne moyenne, acides gras saturés à longue chaîne, acides gras insaturés) a été préalablement ajouté aux 40 g de matière grasse (pour chaque petit-déjeuner) afin de caractériser la cinétique d'absorption des lipides exogènes de manière représentative. Un second repas standardisé a été servi aux sujets 5 heures après la prise du petit-déjeuner. Des prélèvements sanguins ont été effectués tout au long de la journée test afin d'évaluer différents paramètres métaboliques et hormonaux (glycémie, insuline, lipides sanguins). En parallèle, des collectes d'air expiré (breath test) ont été réalisées régulièrement au cours de l'exploration métabolique. Des mesures de calorimétrie indirecte ont servi à calculer l'oxydation des nutriments ; ces mêmes mesures couplées à celles de l'enrichissement en ^{13}C de l'air expiré, nous ont permis de calculer la part de l'oxydation des lipides exogènes. Une collecte des selles suivant chaque journée test a été réalisée afin d'évaluer la perte fécale des lipides, y compris des lipides marqués.

1.2.2. Article



The American Journal of Clinical Nutrition
Official publication of the American Society for Nutrition

The American Journal of Clinical Nutrition
AJCN/2012/043976
Version 1

Controlling absorption and postprandial handling of dietary fatty acids
by structuring fat in the meal

Cécile Vors, Gaëlle Pineau, Laure Gabert, Jocelyne Draï, Corinne Louche-Pelissier, Catherine Defoort, Denis Lairon, Michel Désage, Sabine Danthine, Stéphanie Lambert-Porcheron, Hubert Vidal, Martine Laville, and Marie-Caroline Michalski

This paper includes additional materials for review purposes. To view additional materials, click on the [\[Download Supplemental Files\]](#) link available in the Full MS Info view of the manuscript. To reach this manuscript view, go to <http://submit.ajcn.org>, and log in to your account. Enter the Reviewer Area and click on [Active Reviews](#).

Information for Authors: <http://www.ajcn.org/site/misc/ifa.xhtml>

**Controlling absorption and postprandial handling of dietary fatty acids
by structuring fat in the meal¹⁻³**

Cécile Vors, Gaëlle Pineau, Laure Gabert, Jocelyne Draï,
Corinne Louche-Pélissier, Catherine Defoort, Denis Lairon,
Michel Désage, Sabine Danthine, Stéphanie Lambert-Porcheron,
Hubert Vidal, Martine Laville, and Marie-Caroline Michalski

¹ From Université de Lyon, F-69100 Villeurbanne, France (LG, CLP, MD); INRA U1235, CarMeN, Cardiovascular Metabolism Diabetes and Nutrition laboratory, F-69621 Villeurbanne, France (CV, MCM); INSA-Lyon, IMBL, F-69621 Villeurbanne, France (CV, MCM); INSERM U1060, CarMeN, F-69921 Oullins, France (GP, HV); CRNH Rhône-Alpes, CENS, F-69921 Oullins, France (LG, JD, CLP, MD, SLP, ML, MCM); INSERM UMR1062, Nutrition, Obesity and Risk of Thrombosis laboratory, F-13385, Marseille, France (CD, DL); INRA, UMR1260, F-13385 Marseille, France (CD, DL); Aix-Marseille Univ, Faculté de Médecine, F-13385 Marseille, France (CD, DL); Université de Liège, GxABT, Department of Food Science and Formulation, Gembloux, Belgique (SD); Hospices Civils de Lyon, F-69008 Lyon, France (JD, SLP); Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Lyon Sud (JD).

Authors' last names: Vors, Pineau, Gabert, Draï, Louche-Pélissier, Defoort, Lairon, Désage, Danthine, Lambert-Porcheron, Vidal, Laville, Michalski.

² Work was funded by CNIEL. PhD grant of CV was funded by INRA and CNIEL. CV received a Research Prize from Fondation Nestlé France. HV received financial support from Ezus-Lyon1. Funders had no role in data analysis.

³ Corresponding author, to whom reprints may be requested:

INRA U1235, Cardiovasculaire Métabolisme diabÉtologie et Nutrition, CarMeN, Bâtiment
IMBL, INSA-Lyon, 11 avenue Jean Capelle, 69621 VILLEURBANNE cedex, France
E-mail: marie-caroline.michalski@insa-lyon.fr
Phone: +33 4 72 43 81 12 - Fax: +33 4 72 43 85 24

Abbreviations: AMF: anhydrous milk fat; AP: atom percent; APE: atom percent excess; AUC: area under curve; iAUC: incremental area under curve; CMRF: chylomicron-rich fraction; CRNH-RA: Human Nutrition Research Center Rhône-Alpes; d_{32} : volume-surface mean diameter; dARF: acetate recovery factor; DSC: differential scanning calorimetry; FA: fatty acid; FAME: fatty acid methyl esters; NEFA: non-esterified fatty acid; NW: normal-weight; TAG: triacylglycerol; XRD: X-ray diffraction.

Running title: Fat structuring modifies postprandial metabolism.

Clinical trial registry: Clinical Trials, #NCT01249378

1 **ABSTRACT**

2 **Background:** Exaggerated and prolonged postprandial hypertriglyceridemia is a major risk
3 factor for cardiovascular diseases. In the frame of obesity outbreak, this is associated with a
4 chronic imbalance of lipid distribution towards storage vs β -oxidation.

5 **Objectives:** We aimed to test in humans the concept that structuring fat in the meal can
6 modify dietary fatty acid absorption, chylomicron properties and further metabolic handling.

7 **Design:** 9 normal-weight and 9 obese subjects digested 40g of milkfat ($+^{13}\text{C}$ -triacylglycerols),
8 which was structured either emulsified (“fast fat”) or not (spread fat; “slow fat”), in breakfasts
9 of identical composition. Postprandial lipid metabolism was analyzed over 8h including
10 chylomicron-rich fraction triacylglycerols and size. Fatty acid handling was characterized by
11 plasma kinetics of ^{13}C -fatty acids, exogenous lipid oxidation using breath-test/indirect
12 calorimetry and fecal loss.

13 **Results:** Emulsion provoked earlier ($>1\text{h}$) and sharper peaks of chylomicrons and ^{13}C -fatty
14 acids in plasma vs spread fat in both groups ($P<0.0001$). After 2h, using emulsion vs spread
15 fat, normal-weight subjects presented increased ApoB48 (9.7 ± 0.7 vs 7.1 ± 0.9 mg/L; $P<0.05$)
16 while obese subjects presented larger chylomicrons (218 ± 24 vs 65 ± 8 nm; $P<0.05$). Emulsion
17 induced higher apparent spillover in plasma and sharper ^{13}C -appearance in breath, provoking
18 increased exogenous lipid oxidation: from 45% to 52% in normal-weight subjects ($P<0.05$),
19 40% to 57% in obese ($P<0.01$).

20 **Conclusions:** This study supports a new concept of “slow vs fast fat” whereby intestinal lipid
21 absorption can be controlled by specific structuring of dietary fat to modulate postprandial
22 lipemia and lipid β -oxidation in humans of different BMI.

23

24 **Key words:** intestinal absorption; chylomicron; emulsion; stable isotopes; obesity.

25

26 INTRODUCTION

27 The metabolic importance of nutrient intestinal absorption and of the postprandial period is
28 now recognized in the context of metabolic disease outbreak such as obesity and type 2
29 diabetes (1). Regarding lipid metabolism, kinetics and peak of lipemia as well as chylomicron
30 size are recognized as crucial factors determining metabolic complications (2-4). This is why
31 the control of intestinal lipid absorption and chylomicron dynamics would be a great advance
32 in the management of metabolic diseases. Recent studies reported the implication of oral
33 exposure to high vs low amounts of dietary fat on intestinal lipid absorption (5). The fatty acid
34 (FA) profile of an oral fat load has also been reported to modify chylomicron size (6).
35 However, how to modify the postprandial metabolism of a given lipid amount and its further
36 FA handling remains to be elucidated. In diabetes, the well-known concept of “slow/low
37 glycemic index carbohydrates vs fast/high glycemic index carbohydrates” allowed to develop
38 specific foods or cooking methods to control postprandial glycemia (7). For the control of
39 postprandial lipid handling in the frame of obesity outbreak, we thus raised the question of
40 whether a similar concept may be applicable to dietary fat according to the way it is structured
41 in the meal.

42 Indeed in everyday diet, regardless of their FA composition, lipids are incorporated in food
43 products under different physicochemical structures, e.g., emulsion like ice cream, continuous
44 lipid phase in butter and margarine. Emulsions are the most widespread structures, in food
45 and enteral formula, and are of utmost research interest regarding lipid digestion and
46 absorption (8). Indeed, we demonstrated in rodents the importance of lipid emulsification on
47 FA absorption and final β -oxidation (9-11). However, impact of the kinetics and speed of
48 lipid absorption regarding lipid metabolism and FA handling in humans remains to be
49 elucidated. Importantly, the FA transfer from plasma toward adipose tissue is of utmost
50 importance for fat storage in obese people.

51 We therefore hypothesized that the physicochemical structure of the fat in a meal could
52 modulate postprandial lipemia kinetics and ultimately fat orientation: storage vs oxidation,
53 particularly in obese subjects. This study was thus designed to define the contribution of fat
54 emulsified state and subject BMI on the characteristics of postprandial lipemia and metabolic
55 handling of FA. We investigated the metabolic response to fat-containing meals (40 g)
56 differing only by the structuring of fat, emulsified or not, in healthy young normal weight and
57 obese men, including chylomicron amount and size, FA β -oxidation and loss in feces. We
58 show that a modification of the metabolic impacts of postprandial triglyceridemia kinetics can
59 be obtained thanks to a specifically chosen dietary fat structure, contributing to foresee the
60 “slow vs fast fat” concept.

61

62 **SUBJECTS AND METHODS**

63 **Study design**

64 The study was an open label trial with a cross-over randomized controlled design
65 involving 2 days of metabolic exploration separated by at least three weeks (Online
66 Supplemental Material 1). It was conducted at the Human Nutrition Research Center Rhône-
67 Alpes (CRNH-RA; Lyon, France) according to the Second Declaration of Helsinki and the
68 French Huriet-Serusclet law. The LIPINFLOX study was approved by the Scientific Ethics
69 Committee of Lyon Sud-Est-II and AFSSAPS and registered at Clinical Trials
70 (#NCT01249378). Volunteers received written and oral information and underwent a
71 comprehensive medical history, physical examination and fasting clinical analysis before
72 enrolment. Informed written consent was obtained from all subjects. Volunteers performed
73 trial in the period from April 2010 to July 2011.

74 After an overnight fast, subjects ingested one of the two test breakfasts. During the
75 protocol, all subjects were asked to continue their regular diet and activity except for: the

76 week before and the 3-d period following each exploration day, avoidance of listed food
77 naturally rich in ^{13}C ; 48 h before each exploration day, no alcohol and no exercise; the
78 evening before experiment, consumption of a standardized dinner. Compliance was checked
79 through dietary surveys, 5 days before and 3 days after each exploration day.

80 Primary outcome was the effect of fat emulsification on postprandial lipemia kinetics.
81 Secondary outcomes were related to the effect of fat emulsification and BMI on postprandial
82 lipid metabolism. According to previous studies on lipemia (12) and lipid oxidation (13), a
83 minimum sample size of 8 subjects per BMI group was calculated to be necessary. The
84 random allocation sequence was performed by a CRNH-RA biostatistician using Stat® v.11;
85 two randomization lists were generated stratified over BMI. Subjects were anonymized using
86 a number corresponding to randomization sequence order.

87

88 **Subjects**

89 Twenty-two healthy men were recruited, 11 normal-weight (NW) and 11 obese, among
90 which 20 completed the study (see Flow Diagram online). One subject in each group was not
91 included in data analyses due to abnormal postprandial lipid metabolism; therefore 18 healthy
92 subjects divided in two groups, 9 NW and 9 obese were finally analyzed for the primary
93 outcome, with comparable mean age (**Table 1**). Volunteers were required to be non-smokers,
94 sedentary or having <4h per week of physical activity and non-claustrophobic. We excluded
95 persons under medication interfering with lipid metabolism, with psychological illness, or
96 eating/metabolic disorders. Volunteers were not diabetics. Subjects were required to have
97 stable weight and make no blood donation during 3 months before study. Data were collected
98 at CRNH-RA.

99

100

101 Test meals

102 Test breakfasts were isoenergetic, isonutrient (**Table 2**) and both consisted of bread (50
103 g), skimmed milk (160 mL) and anhydrous milk fat (AMF; 40 g) either spread on bread or
104 emulsified in skim milk and containing 600 mg of tracers. Importantly, both meals had
105 exactly the same composition; no additional emulsifier was added because milk proteins that
106 are naturally present in skim milk are sufficient to provide a submicronic milk fat emulsion.
107 The day before test, a mixture of labelled triacylglycerols (TAG) representing proportionally
108 each FA type present in test fat was first incorporated into melted milk fat: 300 mg of [1,1,1-
109 ¹³C3] tripalmitin for long-chain saturated FA, 210 mg of [1,1,1-¹³C3] triolein for unsaturated
110 FA and 90 mg of [1,1,1-¹³C3] trioctanoin for short- and medium-chain FA (99 atom% ¹³C,
111 Eurisotop, Saint-Aubin, France). For emulsion test, melted labelled milk fat was coarsely pre-
112 mixed in skimmed milk (ProScientific Inc., Oxford, USA) and then further finely emulsified
113 (4 x 1 min using Vibra-cellTM Ultrasonic Processor, Sonics, Newtown, USA) (Online
114 Supplemental Material 2). Test products were then kept at 4°C overnight.

115 A second meal was served 5 hours after breakfast, containing pasta (200 g), turkey (100
116 g), butter (10 g), olive oil (10 g), bread (50 g), stewed fruit (100 g) and providing 713 kcal
117 (2985 kJ) with 29%, 51% and 20% of energy as lipids (22.7 g), carbohydrates (91.5 g) and
118 proteins (35.7 g) respectively.

119 All subjects were given 10 minutes to eat breakfast and 30 minutes for lunch. During the
120 test, participants were allowed to drink 200 mL of water.

121

122 Test fat characterization

123 Emulsion droplet size was measured by Dynamic Light Scattering (Zetasizer Nano S,
124 Malvern, France). Specific surface area of emulsion droplets was calculated using Laser Light
125 Scattering (Mastersizer 2000, Malvern, France). The melting temperature and crystalline state

126 of fat emulsified or not were characterized by Differential Scanning Calorimetry (DSC) using
127 a Q1000 DSC (TA Instruments, New Castle, USA) and by powder X-ray Diffraction (XRD)
128 using a D8 Advance diffractometer (Bruker, Germany).

129

130 **Metabolic explorations**

131 Blood samples were obtained at baseline and at regular intervals after meal, from an
132 antecubital arm vein through a catheter in vacutainer sterile tubes (with EDTA when
133 necessary). Plasma was separated by centrifugation (1500 g, 10 min, 4°C) and stored at -20°C
134 until biochemical analysis or at 4°C for separation of chylomicron-rich fraction (CMRF).

135 Metabolic tests were divided into postprandial phases including a first period of 5 hours (0
136 to 300 min) post-breakfast in the morning, a second period of 3 hours post-lunch (300 to 480
137 min) and the entire exploration day (0 to 480 min).

138 Indirect calorimetry records were performed during metabolic explorations using a
139 Deltatrac II™ calorimeter (Sensormedics, Yorba Linda, CA, USA). Respiratory exchanges
140 (VO_2 and VCO_2) were recorded for periods of 30 or 60 minutes all along 8-h explorations.
141 Substrate oxidations were calculated using Ferrannini's equations (14). Urine was collected at
142 0, 300 and 480 min to determine nitrogen excretion for oxidation calculations.

143 For breath test, expired gas samples were obtained at baseline, each 30 min for 8-h and
144 then at 720 and 1440 min to check return to baseline.

145 Subjects had to collect and freeze their stools individually over 72h after the test day.

146

147 **Plasma metabolite and hormone measurements**

148 Non esterified fatty acid (NEFA) concentrations were determined by enzymatic method
149 Wako® (Neuss, Deutschland). ApoB48 was measured by ELISA (Gentaur, France). Insulin
150 concentration was determined by RIA (CISBIO Bi insuline IRMA, France).

151

152 **Isolation and analysis of chylomicron-rich fractions**

153 To collect the CMRF, 250 μ L of plasma was deposited below a layer of 850 μ L of
154 distilled/deionized water and centrifuged at 80 000 rpm for 30 min using a Sorvall Kendro
155 ultracentrifuge (Asheville, NC, USA). The floating layer was collected and stored at -80°C.

156 TAG concentration of CMRF was measured with a lipase glycerokinase method on a AU
157 2700 Beckman Coulter® (O' Cllagan's mills, Ireland) and expressed as differences in
158 concentration over baseline.

159 Hydrodynamic diameter of CMRF was measured by dynamic light scattering at 25°C
160 using a ZetaSizer NanoS (Malvern, UK) using 1.0658 cP and 1.33 as viscosity and refractive
161 index of the aqueous phase, respectively.

162

163 **¹³C-fatty acids in plasma lipids, NEFA and stools**

164 *Sample preparation.* Internals standards were added according to the fraction analysed
165 (heptadecanoic acid or glycerol triheptadecanoate).

166 *Plasma processing.* Plasma samples were submitted to direct methylation as described
167 previously (15).

168 *NEFA processing.* Total lipids were extracted from plasma aliquots at 120 min digestion
169 (700 μ L) with 3 mL of a mixture of chloroform/methanol (2:1 v/v) according to Folch method
170 (16). NEFA fractions were obtained therefrom by TLC on silica-gel plates with a mobile
171 phase of hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:1 v/v/v). NEFA were derivatized to Fatty
172 Acid Methyl Esters (FAME) (15).

173 *Stool processing.* Fecal collections were weighed, homogenized and a precisely weighed
174 aliquot was collected. Total lipids were extracted according to a modification of the Folch
175 method and derivatized to obtain FAME (15).

176 *Sample analysis.* The amounts of FA in stools, plasma and NEFA were assessed by
 177 GC/MS using a quadrupole mass spectrometer connected to a gas chromatograph (MS 5975
 178 and GC6890, Agilent Technologies, Massy, France). The isotopic enrichment of palmitic and
 179 oleic acids was determined using GC/C/IRMS (Isoprime, GV Instruments, Manchester, UK)
 180 (15). The ^{13}C enrichments were expressed as atom percent excess (APE).

181

182 **Calculations of exogenous lipid oxidation from indirect calorimetry & breath tests**

183 Exogenous lipid oxidation was calculated according to Binnert *et al.* (13) from data of
 184 indirect calorimetry and breath tests. Here the formula was adapted to our use of 3 labelled
 185 triglycerides as follows:

186

187 Exogenous lipid oxidation (% of ingested fat) =

$$188 \frac{\{[\{AP\ CO_2(t) + AP\ CO_2(t_{-30})\} / 2] - AP\ CO_2(t_0)\} / 100 \times \dot{V}\ CO_2}{\{(A) + (B) + (C)\} \times 22.4 \times dARF} \times 100$$

189

190 With: $(A) = \left\{ \left[AP\ ^{13}TG\ C8:0 \right] / 100 \right\} \times [(0.09 / 473.66) \times 27]$

191 $(B) = \left\{ \left[AP\ ^{13}TG\ C16:0 \right] / 100 \right\} \times [(0.30 / 810.30) \times 51]$

192 $(C) = \left\{ \left[AP\ ^{13}TG\ C18:1 \right] / 100 \right\} \times [(0.21 / 888.40) \times 57]$

193

194 Where: AP $\text{CO}_2(t)$ is the AP value of the expired CO_2 at time t , AP $\text{CO}_2(t_0)$ is the AP
 195 value of the expired CO_2 at time t_0 , AP tracers is the calculated AP value of the labelled
 196 mixture of TAG (tracers) and $\dot{V}\ \text{CO}_2$ is the production rate of expired CO_2 (indirect
 197 calorimetry). Mean molecular weights of trioctanoin, tripalmitin and triolein are 473.66
 198 g/mol, 810.30 g/mol and 888.40 g/mol, respectively. Mean number of carbons in trioctanoin,

199 tripalmitin and triolein are 27, 51 and 57, respectively. dARF (Acetate Recovery Factor) is the
200 correction factor for incomplete recovery of ^{13}C bicarbonate (0.505 for NW vs 0.453 for obese
201 (17)) and 22.4 is the volume (L) of a mole of CO_2 .

202

203 **Kinetic parameters**

204 We calculated the incremental area under curve (iAUC); maximum postprandial
205 concentration, delta and diameter (C_{\max} , Δ_{\max} , d_{\max}); time for appearance of these maximum
206 parameters (t_{\max}) and apparition/enlargement-rates between 0 and 60 min.

207

208 **Statistical analysis**

209 Each subject served as his own control. All data are presented as means \pm SEM ($n=9$ per
210 group) and were analysed with Statview 5.0 software (Abacus Concept, Berkeley, CA).
211 Postprandial data were compared by analysis of variance (ANOVA) for repeated measures
212 followed by post-hoc test (Fisher PLSD) for statistical effects of (i) time alone (P_{time}) over the
213 first postprandial period (0-300min), (ii) meal alone (P_{meal}) independently of the time in the
214 postprandial period and (iii) interaction of both factors, time and meal ($P_{\text{time}\times\text{meal}}$). Kinetic
215 parameters were compared by two-way ANOVA followed by Fisher PLSD according to meal
216 and BMI (P_{meal} , P_{BMI} , $P_{\text{meal}\times\text{BMI}}$). Intra-comparisons between meals were performed using a
217 paired Student's t -test and inter-comparisons between subject groups with an unpaired
218 Student's t -test. Differences were considered significant at the $P < 0.05$ level.

219

220 **RESULTS**

221 **Properties of emulsion vs spread fat**

222 Emulsion droplet size (Table 2; Online Supplemental Material 3) shows that we succeeded
223 in providing dramatically different fat structures. A ~ 70000 -fold larger fat surface area was

224 reached with emulsion vs spread fat. To exclude that different metabolic effects could be
225 attributed to fat being more or less liquid/solid at body temperature, we checked that
226 comparable melting profiles and crystalline structures were obtained in all conditions (with or
227 without tracers, emulsified or not, Online Supplemental Material 4). The tested structures thus
228 differed importantly only by emulsified state (Table 2).

229

230 **Kinetics and size of chylomicron-rich fraction**

231 **Figure 1A-B** shows that in both groups, CMRF-TAG rapidly increased (60 min) after
232 ingestion of emulsified fat and peaked at 3-4 h (t_{\max} in **Table 3**). Emulsion induced a
233 significantly earlier and sharper increase in CMRF-TAG than spread fat (Table 3: t_{\max} and
234 Apparition-rate_{0-60min}; $P < 0.001$). These differences were dramatically marked in obese
235 subjects, with a significant delay to absorb spread fat from 0 to 300 min compared to NW
236 subjects ($P < 0.01$, Table 3). At the end of the test, CMRF-TAG of NW subjects came back to
237 lower values regardless of fat structure. Obese subjects showed different kinetics, with
238 CMRF-TAG remaining elevated at the end of the spread fat test: e.g. at 480 min, 0.61 ± 0.15
239 mmol/L for spread vs 0.27 ± 0.06 mmol/L for emulsion above fasting baseline ($P < 0.05$).

240 Mean CMRF size sharply increased in both groups from the first hour after emulsion
241 (Figure 1 C-D; $P_{\text{meal}} < 0.05$ for Enlargment-rate_{0-60min}, Table 3). For NW subjects, CMRF
242 diameters were similar for spread fat and emulsion all along the test. In contrast, in obese
243 people, CMRF diameter was dramatically higher after emulsion vs spread fat from 0 to 240
244 min ($P_{\text{meal}} < 0.05$ and $P_{\text{time}} < 0.001$). Altogether, obese subjects presented larger CMRF than
245 NW subjects ($P < 0.01$ for d_{\max} 0-480 min, Table 3) with persistence of large CMRF after the
246 second meal for spread fat.

247

248 Plasma kinetics of ApoB48

249 Figure 1E-F shows that plasma ApoB48 significantly changed over time in both groups
250 after the two breakfasts ($P_{\text{time}} < 0.0001$) and differently according to the type of breakfast for
251 NW subjects ($P_{\text{time} \times \text{meal}} = 0.001$). At 120 min, NW subjects accumulated more ApoB48 after
252 consumption of emulsion than spread fat (7.08 ± 0.86 mg/L for spread fat vs 9.73 ± 0.69 mg/L
253 for emulsion, $P < 0.05$) and compared with obese subjects for emulsion (7.47 ± 0.78 mg/L, $P <$
254 0.05).

255

256 Plasma kinetics of ^{13}C fatty acid tracers and fecal loss

257 **Figure 2A-B-C-D** shows a significant change in plasma ^{13}C palmitic and ^{13}C oleic acids
258 over time in both groups after the two breakfasts ($P_{\text{time}} < 0.0001$). ^{13}C palmitic acid appeared
259 earlier and sharper in plasma when it was in emulsion form, differences between two
260 breakfasts being greater for obese ($P_{\text{meal}} = 0.007$). For ^{13}C oleic acid, plasma concentrations
261 were higher during 5-h of emulsion digestion, especially for obese subjects ($P_{\text{meal}} = 0.018$ and
262 $P_{\text{time} \times \text{meal}} = 0.0002$). For both tracers, a second peak was observed at 360 min, after ingestion of
263 the second meal in both groups.

264 During the first 300 min for obese subjects, the iAUC for plasma ^{13}C FA were significantly
265 higher after consumption of emulsion vs spread fat ($P < 0.05$, Figure 2B-D). iAUC after
266 spread fat were lower for obese vs NW subjects ($P < 0.05$, Figure 2A-B-C-D).

267 Besides, fecal loss of ^{13}C -palmitic acid was higher than that of ^{13}C -oleic acid (Figure 2E).
268 There was no effect of breakfast type on fecal loss of ^{13}C -palmitic acid in the two groups,
269 whereas a smaller ^{13}C -oleic acid fecal loss occurred after emulsion vs spread fat ($P < 0.05$) in
270 obese subjects.

271

272 Plasma kinetics of insulin and NEFA and apparent dietary fatty acid “spillover”

273 **Figure 3A-B-C-D** shows a significant change in plasma insulin and NEFA over time after
274 the two breakfasts in both groups ($P_{\text{time}} < 0.0001$). Over the first 300 min, NEFA kinetics
275 presented a meal type x time interaction in both groups, with the decrease in plasma NEFA at
276 120 min being lower for emulsion than spread (Figure 3C-D). Therefore, we measured ^{13}C
277 enrichment in plasma NEFA at 120 minutes (Figure 3E) to estimate whether this would result
278 from the contribution of exogenous FA, so-called apparent fatty acid “spillover”. We
279 observed higher apparent “spillover” during the postprandial phase of emulsion vs spread fat,
280 in both groups ($P < 0.05$ for NW and $P < 0.01$ for obese subjects, Figure 3E). For spread fat,
281 contribution of exogenous FA to total NEFA was lower in obese vs NW subjects ($P < 0.01$).

282

283 Kinetics of expired $^{13}\text{CO}_2$

284 The ^{13}C appearance in expired CO_2 represents the final product of FA β -oxidation. A
285 significant change in APE occurred over time in both groups ($P_{\text{time}} < 0.0001$). A sharper
286 increase of $^{13}\text{CO}_2$ occurred for 300 min after spread fat ingestion for NW vs obese subjects
287 (**Figure 4A-B**; $P < 0.01$ for Apparition-rate_{0-60min}, Table 3). In both groups, APE was higher
288 after consumption of emulsion vs spread fat over the first 300 min, revealing improvement of
289 dietary fat β -oxidation using emulsified form. APE returned to baseline after 720 min.

290 Inserts in Figure 4A-B show that iAUC of expired $^{13}\text{CO}_2$ after 300 min for emulsion was
291 significantly higher than for spread fat in both groups ($P < 0.01$ for NW subjects and $P < 0.001$
292 for obese subjects). Besides, over the metabolic day (0-480 min), obese subjects presented
293 higher iAUC of expired $^{13}\text{CO}_2$ after consuming emulsion vs spread fat ($P < 0.05$, Table 3).
294 Altogether, the structuring of fat in the meal significantly affected the kinetic parameters of
295 $^{13}\text{CO}_2$ air enrichment regardless of BMI while BMI affected iAUC and Apparition-rate_{0-60min}
296 (Table 3).

297

298 **Exogenous lipid fate**

299 We studied the metabolic handling of exogenous lipids by evaluating the fractions of
300 ingested lipids that have been either oxidized or lost in feces, and so estimated the remaining
301 fraction stored in body pools. For the same quantity and composition of ingested fat, all
302 subjects β -oxidized FA better when fat was emulsified, and more markedly in obese subjects
303 ($P < 0.01$; Figure 4C). In turn, the calculated fraction of ingested lipids oriented towards
304 storage in body pools seemed to be lower after emulsion vs spread. Accounting for the part of
305 exogenous lipids lost in feces (Figure 4C), the percentage of exogenous lipid oxidation
306 according to the fraction that has been intestinally absorbed was higher for NW and obese
307 subjects after emulsion vs spread fat ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, Figure 4D).

308 Total lipid oxidation was unchanged with the two test meals in both groups but with a
309 greater relative contribution of exogenous lipids ingested at breakfast as emulsion vs spread
310 fat (Figure 4E).

311

312 **DISCUSSION**

313 Postprandial hyperlipemia is a recognized risk factor for atherosclerosis (4), resulting from
314 the concentration of triglyceride-rich lipoproteins remaining high due to poor clearance from
315 blood. Moreover in obesity, the unbalance of FA orientation towards β -oxidation or storage is
316 of utmost importance. We therefore investigated whether structuring fat in the meal could
317 modify the entire frame of postprandial lipid metabolism, from the amount and size of
318 chylomicrons to final β -oxidation and including fecal loss. To this aim, labelled breakfasts
319 containing fat either spread or emulsified were fed to normal-weight and obese subjects.

320 Importantly, test meals were designed of equal composition including milk fat, skimmed
321 milk and bread. Thus, factors commonly studied like FA composition or protein content,

322 cannot be involved in the presently observed differences in lipid metabolization patterns,
323 which can be uniquely attributed to the fat physico-chemical structure in the meal. The
324 chylomicron TAG profile during postprandial phase of emulsion differed from that of spread
325 fat, with a peak being more rapid, enhanced and sooner cleared especially in obese subjects.
326 This is consistent with reports of enhanced FA absorption when a simple bolus of vegetable
327 oil was emulsified, both in humans (18) and rodents (10, 11, 19). This can be explained by the
328 fact that compared with spread fat, our emulsion represented about 70000-times greater
329 surface area available for lipases, which is largely reported to improve lipolysis and thus
330 stimulating absorption (20). In this respect, Armand *et al.* reported that enteral emulsions of
331 different droplet sizes, ~ 1 vs ~ 10 μm , resulted in small differences only in postprandial
332 lipemia in humans (12). The dramatic differences observed in the present work are due to the
333 extreme structure differences, no emulsion (spread) vs fine emulsion droplets of ~ 1 μm .
334 Importantly, our study provides a proof of concept that such effects can occur in the context
335 of a mixed meal whereas previous studies used only simple oil or emulsion bolus fed either
336 orally or intragastrically (20,12). Regarding the effect of emulsifier type, our fat was
337 emulsified by the milk proteins naturally present in skim milk, known to remain stable in the
338 acid gastric conditions. Emulsions formulated with caseins and monoacylglycerols were
339 recently reported to result in lower postprandial plasma triglycerides than using lecithin in
340 non-obese humans (21), and we showed that *in vitro* digestive lipolysis was enhanced with
341 lecithin vs casein as emulsifier (22). Because in our study obese subjects were the most
342 affected by fat emulsification in the meal, further studies should test the effect of different
343 emulsifiers on their postprandial lipid metabolism. Of note, the importance of sensory
344 exposure to lipids on postprandial metabolism in humans was recently revealed (5).
345 Therefore, we cannot exclude a contribution of differences in oral fat perception between test
346 meals in our observed differences of postprandial lipemia.

347 Triglyceride-rich lipoproteins remaining elevated all along the postprandial phase, partly
348 due to impaired clearance especially regarding chylomicrons and their remnants, are known to
349 be an independent CVD risk factor (2, 3). Therefore, peaks of lipemia with a rapid clearance
350 would be more favourable than a steady increase of lipemia with a delayed accumulation of
351 chylomicron remnants (1). Our study shows for the first time in NW and obese humans that
352 cycles of postprandial lipemia can be modulated by structuring the fat in mixed meal.

353 Strikingly, obese subjects presented a marked delay to increase CMRF-TAG after spread
354 fat. Overweight men were also reported to present delayed TAG-rich lipoprotein metabolism
355 compared to lean men after a high-fat load (23). Presently observed differences between the
356 two breakfasts in obese subjects could be explained by their low pancreatic secretion, as
357 reported in response to a liquid fat-rich meal in obese vs lean subjects together with lower
358 levels of gallbladder emptying (24). Therefore, with less pancreatic lipase present, obese
359 subjects can better hydrolyze a pre-emulsified fat compared to the same amount of non-
360 emulsified fat, despite the reported slow gastric processing of emulsions (12).

361 Immediately after lunch, an increase of FA tracers appeared in plasma with a characteristic
362 peak at 360 min. This so-called “second-meal effect” is known as the contribution of lipids
363 from a first meal to lipemia after a next meal (25). Of note, for obese subjects the marked
364 delay in postprandial lipemia appearance after spread fat cumulated with the second meal
365 effect. Indeed, spread fat continued to contribute to lipemia during the entire afternoon
366 together with lunch, causing elevated lipemia until test ended. In contrast, obese subjects
367 (without fasting hyperlipidemia herein) did not have difficulties to absorb emulsion, with a
368 return of lipemia to baseline at the end of the test.

369 In NW subjects, higher CMRF with emulsion corresponded transiently to a increased
370 number of lipoproteins particles, as revealed by the similar CMRF-size associated with an
371 increased ApoB48 level at 120 min. In obese subjects however, ApoB48 levels remained

372 equivalent regardless of fat structure so that the increase in lipemia after emulsion was not
373 due to an increase in particle number but to an increased CMRF size, i.e., each chylomicron
374 particle contained more TAG following emulsion *vs* spread fat.

375 Importantly, the few reports about emulsions usually determined solely lipemia or plasma
376 fatty acid concentrations as endpoints. For the first time to our knowledge, using a design
377 including fecal loss and lipid fate, our study shows that fat emulsification further affects the
378 metabolic handling of exogenous FA, including final β -oxidation. Early apparition of ^{13}C in
379 breath was due to the rapid β -oxidation of short-chain FA, which are absorbed directly in the
380 portal vein to be oxidized by the liver (26) and not recovered in plasma. Obesity is commonly
381 associated with a defect in the β -oxidation of dietary FA (13). Hodson *et al.* recently
382 challenged this idea by showing greater FA β -oxidation in obese men and attributed this to
383 specific FA acid partitioning (27). Importantly, we now show that exogenous FA oxidation
384 can be enhanced in obese men by providing fat in an emulsified form. We therefore examined
385 the design of tracer tests in literature. Discrepancies between previous reports can in fact be
386 explained by the present “fast *vs* slow lipid” notion because lower β -oxidation in obese *vs*
387 lean subjects was observed using a single oil bolus (13) whereas high β -oxidation in obese
388 was observed when the tracer was dispersed into an emulsion (27), an aspect which had never
389 been taken into account by previous authors. Moreover, recent studies concluded in advising
390 emulsification to enhance the bioaccessibility and intestinal absorption of essential fatty acids,
391 thus ensuring intakes consistent with dietary guidelines (18). However, considering our
392 present results, we must highlight the risk that such essential FA fastly absorbed can be finally
393 lost in the β -oxidation process rather than being bioavailable for cell membrane turnover in
394 body pools. Therefore, further studies on the structuring of oils rich in essential PUFA should
395 investigate the final postprandial metabolic handling of these specific FA.

396 The observed enhancing effect of emulsification on exogenous lipid oxidation cannot be
397 due to differences in intestinal absorption because the fecal loss of exogenous lipids was
398 overall similar between test breakfasts and groups. Importantly, total lipid oxidation during
399 exploration day was unchanged by fat structuring. However, the source of β -oxidized FA was
400 different: using emulsion, exogenous FA ingested at breakfast were favored towards β -
401 oxidation pathways. In contrast using spread fat, more endogenous FA and/or exogenous FA
402 ingested at lunch were oxidized so that exogenous FA ingested at breakfast were more
403 oriented towards storage. This is consistent with the greater apparent FA “spillover” for both
404 groups after emulsion and can be explained by the greater intestinal absorption, resulting in a
405 sooner lipolysis of chylomicrons that generates exogenous NEFA (28). In turn, this early
406 influx of exogenous NEFA can serve as fuel for the tissues and explain the higher
407 contribution of exogenous FA to total FA oxidation using emulsion in both groups.

408 In summary, we demonstrate that the postprandial metabolic handling of dietary FA can be
409 greatly modified by emulsifying fat in the meal, especially in obese subjects. Consequently,
410 this study supports the further exploration of a possible dietary concept of “fast vs slow lipid
411 structuring” for the nutritional management of metabolic diseases. Our results in the
412 postprandial phase raise the questions of whether (i) daily ingestion of “fast vs slow fat”
413 would result in different lipid metabolisms, adiposity and/or cardiovascular risk markers in
414 the long term and (ii) the composition and structuring of dietary lipids could be optimized to
415 this aim. This should be the subject of further long-term intervention studies.

416

417 **Acknowledgements**

418 We thank volunteers for their involvement. J Peyrat, C Maitrepierre, N Torche are
419 acknowledged for technical assistance, M Sothier for dietary survey analysis, and C Louche-

420 Pelissier, A Faure, M Cervantes, C Norbert and S Gonin for management of lipid analyses. B
421 Morio, JM Antoine, C Boyer and C Marmonier are acknowledged for useful discussions.
422 Corman SA (N Vaghefi) is acknowledged for kindly providing AMF, Lactalis R&D (P Le
423 Ruyet) for providing skimmed milk powder, and Sodiaal-Candia R&D (O Cousin, G Vialaret)
424 for preparing and processing bottled flavoured skimmed milk.

425

426 The authors' responsibilities were as follows — CV: designed research, conducted research,
427 analyzed data, wrote paper, statistical analysis; GP: conducted research, technical support;
428 LG: conducted research, technical support, analyzed data; JD: conducted research, technical
429 and material support, analyzed data; CLP: conducted research, technical support; CD:
430 acquisition of data, technical support; DL: critical revision of the manuscript for important
431 intellectual content; MD: conducted research, analyzed data; SD: technical support, analyzed
432 data; SLP: designed research, administrative support; HV: critical revision of the manuscript
433 for important intellectual content; ML: critical revision of the manuscript for important
434 intellectual content; MCM: designed research, study supervision, analyzed data, wrote paper,
435 had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final
436 manuscript. No conflict of interest exists for this manuscript.

REFERENCES

1. Lopez-Miranda J, Williams C, Lairon D. Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. *Br J Nutr* 2007;98:458-73.
2. Maggi FM, Raselli S, Grigore L, Redaelli L, Fantappie S, Catapano AL. Lipoprotein remnants and endothelial dysfunction in the postprandial phase. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2946-50.
3. Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarenco P, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J* 2011;32:1345-61.
4. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007;298:299-308.

5. Chavez-Jauregui RN, Mattes RD, Parks EJ. Dynamics of fat absorption and effect of sham feeding on postprandial lipemia. *Gastroenterology* 2010;139:1538-48.
6. Sakr SW, Attia N, Haourigui M, et al. Fatty acid composition of an oral load affects chylomicron size in human subjects. *Br J Nutr* 1997;77:19-31.
7. Willett W, Manson J, Liu S. Glycemic index, glycemic load, and risk of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2002;76:274S-80S.
8. McClements DJ, Decker EA, Park Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009;49:48-67.
9. Michalski MC, Soares AF, Lopez C, Leconte N, Briard V, Geloën A. The supramolecular structure of milk fat influences plasma triacylglycerols and fatty acid profile in the rat. *European Journal of Nutrition* 2006;45:215-224.
10. Michalski MC, Briard V, Desage M, Geloën A. The dispersion state of milk fat influences triglyceride metabolism in the rat—a ^{13}C breath test study. *Eur J Nutr* 2005;44:436-44.
11. Laugerette F, Vors C, Geloën A, et al. Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *J Nutr Biochem* 2011.
12. Armand M, Pasquier B, Andre M, et al. Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am J Clin Nutr* 1999;70:1096-106.
13. Binnert C, Pachiaudi C, Beylot M, et al. Influence of human obesity on the metabolic fate of dietary long- and medium-chain triacylglycerols. *Am J Clin Nutr* 1998;67:595-601.
14. Ferrannini E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism* 1988;37:287-301.
15. Gabert L, Vors C, Louche-Pelissier C, et al. ^{13}C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1- ^{13}C]tripalmitin and [1,1,1- ^{13}C]triolein. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;25:2697-703.
16. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
17. Antoun E, Momken I, Bergouignan A, et al. The [1- ^{13}C]acetate recovery factor to correct tracer-derived dietary fat oxidation is lower in overweight insulin-resistant subjects. *The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 2010;5:173-179.
18. Garaiova I, Guschina IA, Plummer SF, Tang J, Wang D, Plummer NT. A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification. *Nutr J* 2007;6:4.
19. Couedelo L, Boue-Vaysse C, Fonseca L, et al. Lymphatic absorption of alpha-linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion. *Br J Nutr* 2011;105:1026-35.
20. Delorme V, Dhoub R, Canaan S, Fotiadu F, Carriere F, Cavalier JF. Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition. *Pharm Res* 2011;28:1831-42.
21. Keogh JB, Wooster TJ, Golding M, Day L, Otto B, Clifton PM. Slowly and rapidly digested fat emulsions are equally satiating but their triglycerides are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr* 2011;141:809-15.
22. Vors C, Capolino P, Guerin C, et al. Coupling in vitro gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions. *Food Funct* 2012.
23. Nabeno-Kaeriyama Y, Fukuchi Y, Hayashi S, Kimura T, Tanaka A, Naito M. Delayed postprandial metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in obese young men compared to lean young men. *Clin Chim Acta* 2010;411:1694-9.

24. Wisen O, Johansson C. Gastrointestinal function in obesity: motility, secretion, and absorption following a liquid test meal. *Metabolism* 1992;41:390-5.
25. Silva KD, Wright JW, Williams CM, Lovegrove JA. Meal ingestion provokes entry of lipoproteins containing fat from the previous meal: possible metabolic implications. *Eur J Nutr* 2005;44:377-83.
26. Michalski MC. Specific molecular and colloidal structures of milk fat affecting lipolysis, absorption and postprandial lipemia. *Eur J Lipid Sci Technol* 2009;111.
27. Hodson L, McQuaid SE, Humphreys SM, et al. Greater dietary fat oxidation in obese compared with lean men: an adaptive mechanism to prevent liver fat accumulation? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E584-92.
28. Fielding B. Tracing the fate of dietary fatty acids: metabolic studies of postprandial lipaemia in human subjects. *Proc Nutr Soc* 2011;70:342-50.

Table 1. Anthropometric and fasting metabolic subject parameters.

	Normal weight (<i>n</i> =9)	Obese (<i>n</i> =9)	<i>P</i> value
Anthropometric parameters			
Age (years)	28.3 ± 1.4	30.2 ± 2.2	<i>ns</i>
Body weight (kg)	72.0 ± 2.1	101.2 ± 1.9	< 0.0001
BMI (kg.m ⁻²)	22.3 ± 0.5	31.7 ± 0.3	< 0.0001
Waist circumference (cm)	83.3 ± 1.6	105.9 ± 0.8	< 0.0001
Fasting metabolic parameters			
Glucose (mM)	4.94 ± 0.16	5.19 ± 0.15	<i>ns</i>
Insulin (mIU/L)	3.75 ± 0.59	7.14 ± 0.95	0.008
HOMA	0.85 ± 0.14	1.69 ± 0.25	0.009
Total cholesterol (mM)	4.85 ± 0.22	4.89 ± 0.24	<i>ns</i>
HDL cholesterol (mM)	1.51 ± 0.10	1.09 ± 0.06	0.004
LDL cholesterol (mM)	3.03 ± 0.27	3.11 ± 0.21	<i>ns</i>
Triacylglycerols (mM)	0.85 ± 0.06	1.39 ± 0.18	0.017

Data are means ± SEM. Groups are compared using unpaired Student's *t*-test.

Table 2. Composition of the test breakfasts and physico-chemical properties of milk fat.

Breakfast composition				
	Quantity (g or mL)	Carbohydrates (g)	Proteins (g)	Lipids (g)
Anhydrous Milk Fat ¹	40	-	-	40
Skimmed milk ²	160	7.5	5.3	0.3
Bread	50	28	4	0.5
[1,1,1- ¹³ C ₃] trioctanoin	0.09	-	-	0.09
[1,1,1- ¹³ C ₃] tripalmitin	0.30	-	-	0.30
[1,1,1- ¹³ C ₃] triolein	0.21	-	-	0.21
Total (g)	250.6	35.5	9.3	41.4
% caloric intake		26	7	67
Fat properties³				
Structure	Droplet size⁴ (µm)	d₃₂⁵ (µm)	Fat surface area in meal⁶ (m²)	Melting temperature⁷ (°C)
Spread	-	-	0.006	42
Emulsion	1.04	0.63	410	40

¹ Fatty acid profile of TAG includes 68.6% SFA, 28.1% MUFA and 3.3% PUFA.

² Natural vanillia-flavoured.

³ Mixture of milk fat + ¹³C-TAG tracers.

⁴ Diameter of the peak of maximum intensity measured by DLS.

⁵ Surface averaged diameter measured by LLS.

⁶ For Spread fat: calculated as the surface of an equivalent sphere of 40 g. For Emulsion: calculated from the specific surface area (m² per g fat) calculated by the software, further multiplied by fat content in the meal.

⁷ Temperature at which the entire fat amount is in liquid form.

Table 3. Kinetic parameters after digestion of test breakfasts in NW vs obese subjects.

Parameter	Spread fat 40 g		Emulsified fat 40 g		P value		
	Normal-weight	Obese	Normal-weight	Obese	P_{meal}	P_{BMI}	P_{mealxBMI}
0-480 min:							
Δ_{max} (mmol/L)	0.63 ± 0.13	0.80 ± 0.12	0.75 ± 0.09	0.94 ± 0.25	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
iAUC (mmol·min/L)	132.8 ± 29.1	165.6 ± 23.1	180.4 ± 28.2	218.1 ± 53.2	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
t_{max} (min)	293 ± 23	367 ± 33	220 ± 42	207 ± 25	< 0.001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Apparition-rate _{0-60 min} (μmol/L/min)	0.32 ± 0.27	0.14 ± 0.32	2.85 ± 0.72	2.93 ± 0.6	<0.0001	<i>ns</i>	<i>ns</i>
0-300 min:							
Δ_{max} (mmol/L)	0.56 ± 0.10	0.53 ± 0.09	0.74 ± 0.09	0.94 ± 0.25	0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>
iAUC (mmol·min/L)	81.4 ± 18.2	57.6 ± 10.7	127.7 ± 17.4	159.3 ± 39.6	<i>ns</i>	< 0.01	<i>ns</i>
t_{max} (min)	233 ± 16	267 ± 15	167 ± 17	193 ± 17	<0.0001	< 0.1	<i>ns</i>
330-480 min:							
Δ_{max} (mmol/L)	0.54 ± 0.13	0.80 ± 0.12	0.54 ± 0.11	0.56 ± 0.14	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
iAUC (mmol·min/L)	51.4 ± 12.9	107.9 ± 17.7	52.7 ± 11.2	58.8 ± 14.7	< 0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>
t_{max} (min)	347 ± 5	390 ± 23	397 ± 19	420 ± 24	< 0.05	< 0.1	<i>ns</i>
CMRF Size							
0-480 min:							
d_{max} (nm)	253 ± 34	494 ± 93	262 ± 20	344 ± 58	<i>ns</i>	< 0.01	<i>ns</i>
t_{max} (min)	243 ± 25	307 ± 23	207 ± 30	237 ± 33	< 0.1	0.1	<i>ns</i>
Enlargement-rate _{0-60m} (μmol/L/min)	-0.06 ± 0.07	-0.02 ± 0.11	0.65 ± 0.11	1.26 ± 0.78	< 0.05	<i>ns</i>	<i>ns</i>
0-300 min:							
d_{max} (nm)	246 ± 35	296 ± 70	239 ± 12	336 ± 58	<i>ns</i>	< 0.1	<i>ns</i>
t_{max} (min)	180 ± 17	200 ± 41	200 ± 26	193 ± 28	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
330-480 min:							
d_{max} (nm)	195 ± 10	451 ± 96	207 ± 28	236 ± 46	< 0.1	< 0.05	< 0.05
t_{max} (min)	337 ± 4	367 ± 17	340 ± 5	360 ± 16	<i>ns</i>	< 0.05	<i>ns</i>
¹³CO₂ enrichment							
0-720 min:							
C_{max} (%)	0.019 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.019 ± 0.001	0.016 ± 0.001	< 0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>
AUC (%·min)	6.9 ± 0.5	4.8 ± 0.8	7.7 ± 0.2	6.4 ± 0.5	< 0.01	< 0.001	<i>ns</i>
t_{max} (min)	310 ± 21	347 ± 23	267 ± 26	267 ± 17	< 0.01	<i>ns</i>	<i>ns</i>
Apparition-rate _{0-60 min} (%/min)	6.0 · 10 ⁻⁵ ± 1.7 · 10 ⁻⁵	2.0 · 10 ⁻⁵ ± 0.5 · 10 ⁻⁵	13.6 · 10 ⁻⁵ ± 1.9 · 10 ⁻⁵	9.8 · 10 ⁻⁵ ± 0.8 · 10 ⁻⁵	< 0.0001	< 0.01	<i>ns</i>
0-300 min:							
C_{max} (mmol/L)	0.018 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.019 ± 0.001	0.016 ± 0.001	< 0.05	< 0.0001	< 0.05
AUC (%·min)	2.9 ± 0.3	1.6 ± 0.4	3.9 ± 0.2	3.2 ± 0.2	< 0.0001	< 0.0001	<i>ns</i>
t_{max} (min)	283 ± 17	293 ± 7	257 ± 23	260 ± 14	< 0.1	<i>ns</i>	<i>ns</i>
300-720 min:							
C_{max} (mmol/L)	0.019 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.017 ± 0.001	0.016 ± 0.001	<i>ns</i>	0.0001	< 0.05
AUC (%·min)	3.9 ± 0.4	3.2 ± 0.5	3.8 ± 0.3	3.1 ± 0.4	<i>ns</i>	< 0.1	<i>ns</i>
t_{max} (min)	333 ± 3	360 ± 18	330 ± 0	330 ± 0	< 0.1	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Data are means ± SEM, $n=9$ per group. C_{max} indicates maximum concentration; d_{max} indicates maximum diameter; Δ_{max} indicates maximum concentration delta; iAUC, incremental area under the curve; AUC, area under the curve. P values (P_{meal} , P_{BMI} and P_{mealxBMI}) obtained by ANOVA followed by post hoc Fisher PLSD.

Figure Caption

Figure 1. Postprandial kinetics after consuming spread fat (□, ■) or emulsion (○, ●): CMRF-TAG (mM) in NW (A) and obese subjects (B) and corresponding iAUC; CMRF size (nm) in NW (C) and obese subjects (D); ApoB48 (mg/L) in NW (E) and obese subjects (F). Data are means ±SEM, $n=9$ per group; P_{time} , P_{meal} and $P_{\text{time} \times \text{meal}}$ for postprandial period from 0 to 300 min (repeated measures-ANOVA followed by post-hoc Fisher PLSD).

(B) ** $P < 0.01$ for time 420 min emulsion vs spread fat (paired Student's t -test); * $P < 0.05$ for time 480 min emulsion vs spread fat (paired Student's t -test);

(D) * $P < 0.05$ for time 120 min emulsion vs spread fat (paired Student's t -test)

(C-D) §§ $P < 0.01$ for time 120 min obese vs NW subjects (unpaired Student's t -test);

(E-F) * $P < 0.05$ for time 120 min emulsion vs spread fat (paired Student's t -test), § $P < 0.05$ for time 120 min obese vs NW subjects (unpaired Student's t -test).

Figure 2. Postprandial kinetics and iAUC of total plasma lipids of ^{13}C -palmitic acid (mM) and ^{13}C -oleic acid (mM) in NW (A & C, respectively) and obese subjects (B & D, respectively) consuming spread fat (□, ■) or emulsion (○, ●). (E) Fecal loss of ^{13}C - palmitic acid (plain bars) and ^{13}C -oleic acid (dashed bars) in NW (white) and obese subjects (grey).

Data are means ±SEM, $n=9$ per group; P_{time} , P_{meal} and $P_{\text{time} \times \text{meal}}$ for postprandial period from 0 to 300 min (repeated measures-ANOVA followed by post-hoc Fisher PLSD).

(A-B) * $P < 0.05$ for obese iAUC 0-300 min emulsion vs spread fat (paired Student's t -test), § $P < 0.05$ for spread fat iAUC 0-300 min obese vs NW subjects (unpaired Student's t -test), § $P < 0.1$ for obese iAUC 0-480 min emulsion vs spread fat (paired Student's t -test); (C-D) * $P < 0.05$ for obese iAUC 0-300 min emulsion vs spread fat (paired Student's t -test), § $P < 0.05$ for spread fat iAUC 0-300 min obese vs NW subjects (unpaired Student's t -test); (E) no common letter indicates a statistical difference, $P < 0.05$ (paired and unpaired Student's t -test).

Figure 3. Postprandial kinetics of insulin (mUI/L) and NEFA (μM) in NW (A & C, respectively) and obese subjects (B & D, respectively) consuming spread fat (\square , \blacksquare) or emulsion (\circ , \bullet). (E) ^{13}C -enrichment of plasma NEFA at 120 min, estimating so-called apparent fatty acid “spillover” (white: spread fat, black: emulsion).

Data are means \pm SEM, $n=9$ per group; P_{time} , P_{meal} and $P_{\text{time}\times\text{meal}}$ for postprandial period from 0 to 300 min (repeated measures-ANOVA followed by post-hoc Fisher PLSD).

(C) $**P < 0.01$ for NW subjects at 120 min emulsion vs spread fat (paired Student’s t -test);

(D) $*P < 0.05$ for obese subjects at 120 min emulsion vs spread fat (paired Student’s t -test);

(E) $*P < 0.05$ for NW subjects at 120 min emulsion vs spread fat (paired Student’s t -test);

$**P < 0.01$ for obese subjects at 120 min emulsion vs spread fat (paired Student’s t -test); $**P < 0.01$ for spread fat at 120 min NW vs obese subjects (unpaired Student’s t -test).

Figure 4. Postprandial kinetics of ^{13}C -appearance in breath in NW subjects (A) and obese subjects (B) consuming spread fat (\square , \blacksquare) or emulsion (\circ , \bullet); (C) Exogenous lipid fate, either oxidized (white), lost in feces (black) or stored (grey, calculated as “total – (lost+oxidized)”) in NW and obese subjects over 480 min; (D) Oxidation of intestinally absorbed lipids in NW and obese subjects over 480 min after consuming spread fat (white) or emulsion (black); (E) Total lipid oxidation (total bar) and fraction of cumulative exogenous lipid oxidation (dashed) over 480 min after consuming test breakfasts in NW vs obese subjects.

Data are means \pm SEM, $n=9$ per group.

(C-D-E) $*P < 0.05$ for NW subjects and $P < 0.01$ for obese subjects emulsion vs spread fat (paired Student’s t -test).

Supporting material :

Online Supplemental Material 1. (A) Study design; (B) Procedure of an exploration day.

Online Supplemental Material 2. Preparation of fat including tracers for test breakfasts.

Online Supplemental Material 3. Particle size analysis by DLS of emulsion used in test breakfast.

Online Supplemental Material 4. Thermal properties of anhydrous milk fat: AMF: anhydrous milk fat without tracers. Test spread fat: AMF including tracers as used in test breakfast. Test emulsion: AMF including tracers emulsified in skimmed milk as used in test breakfast.

A-C: melting profiles measured by DSC. B-D: crystalline state analyzed by XRD.

Figure 1

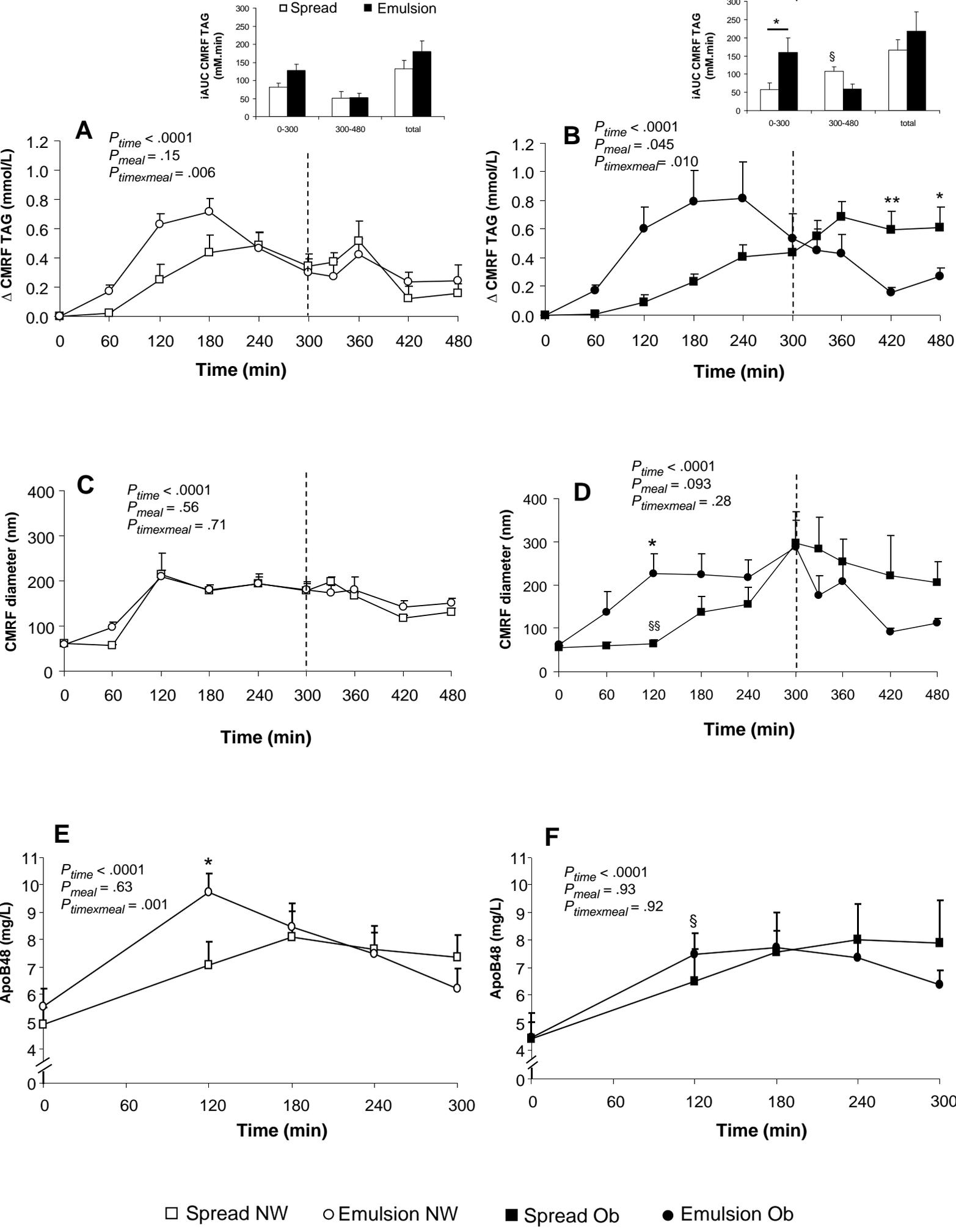


Figure 2

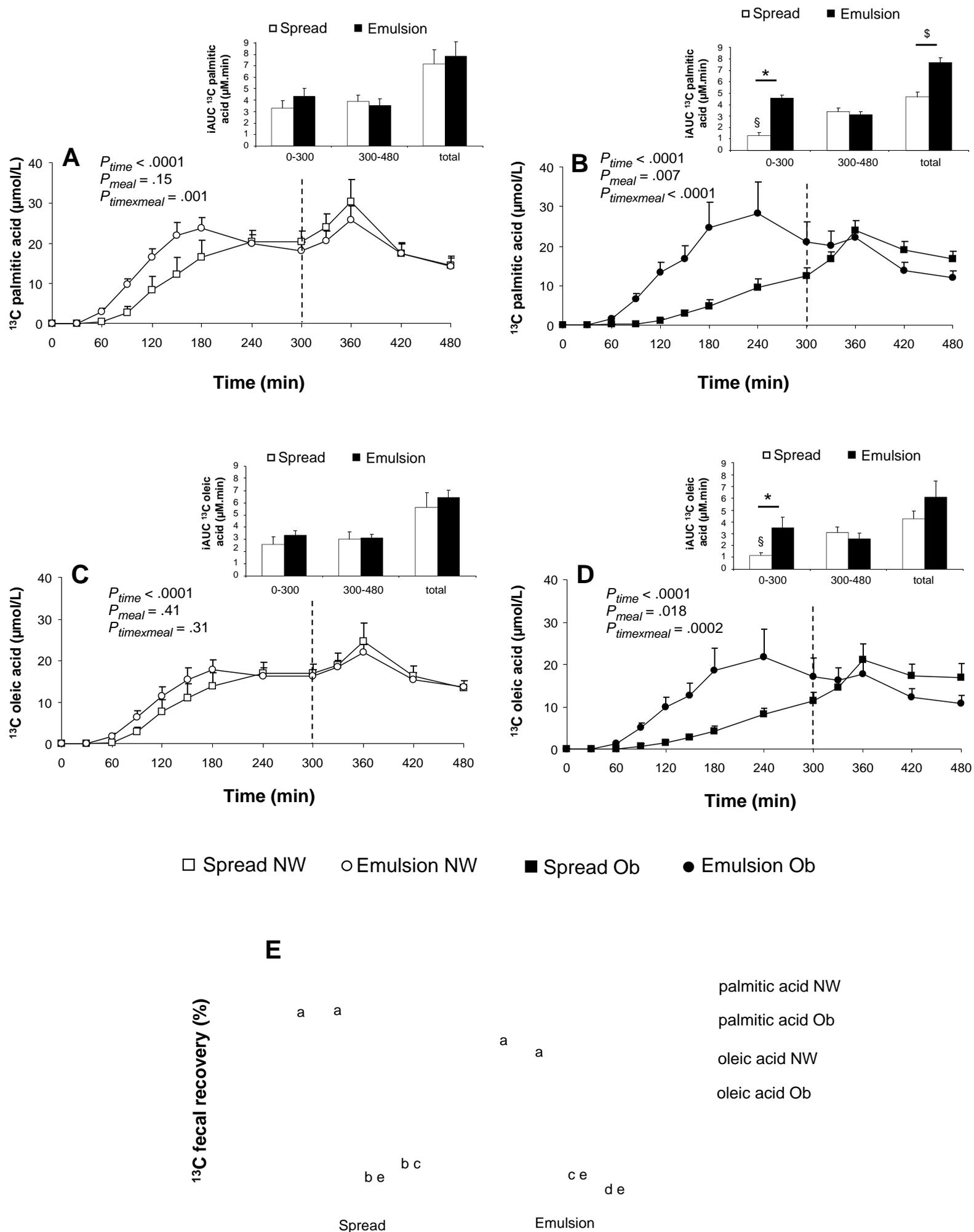


Figure 3

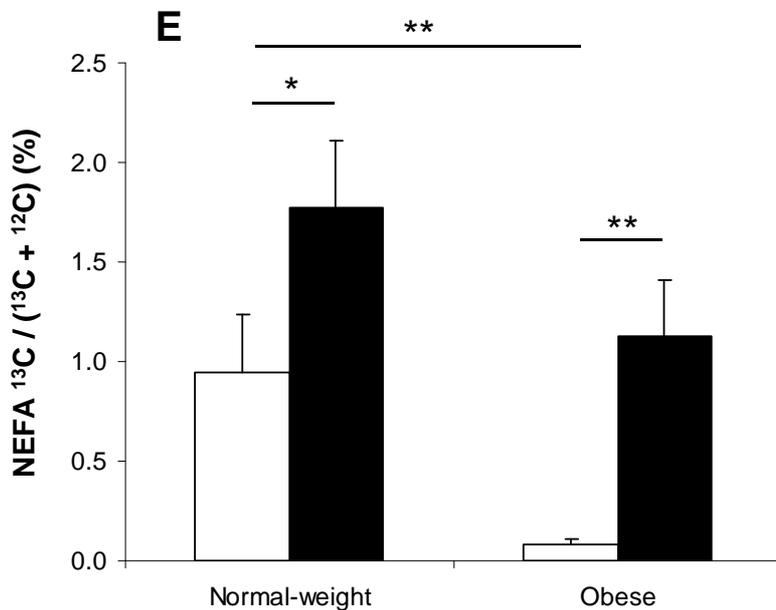
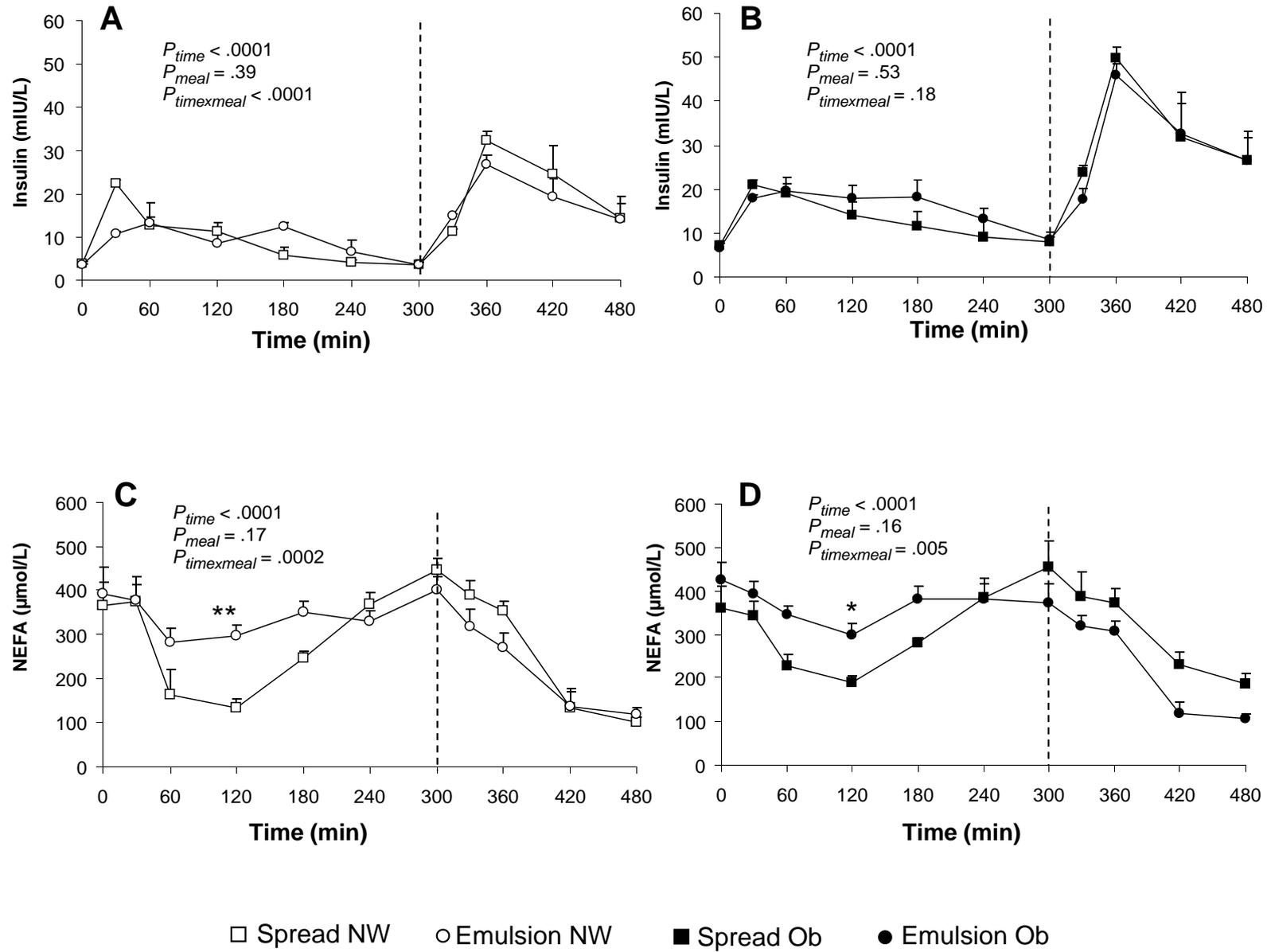
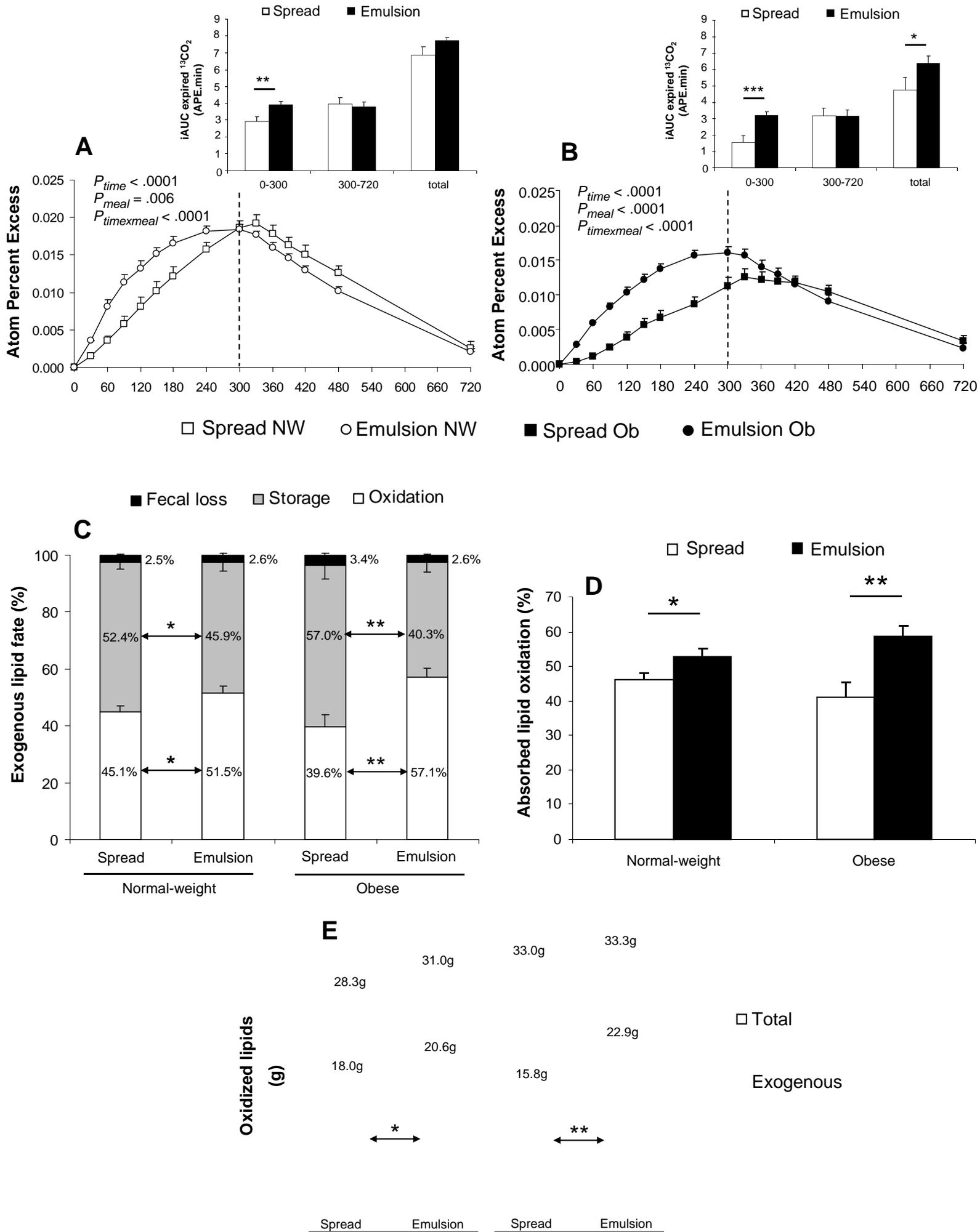


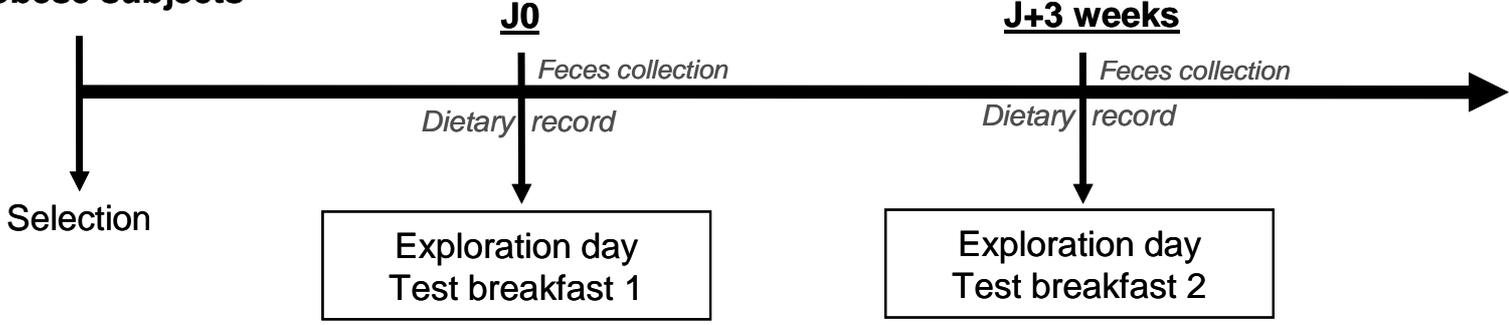
Figure 4



Supplementary Figure 1

A

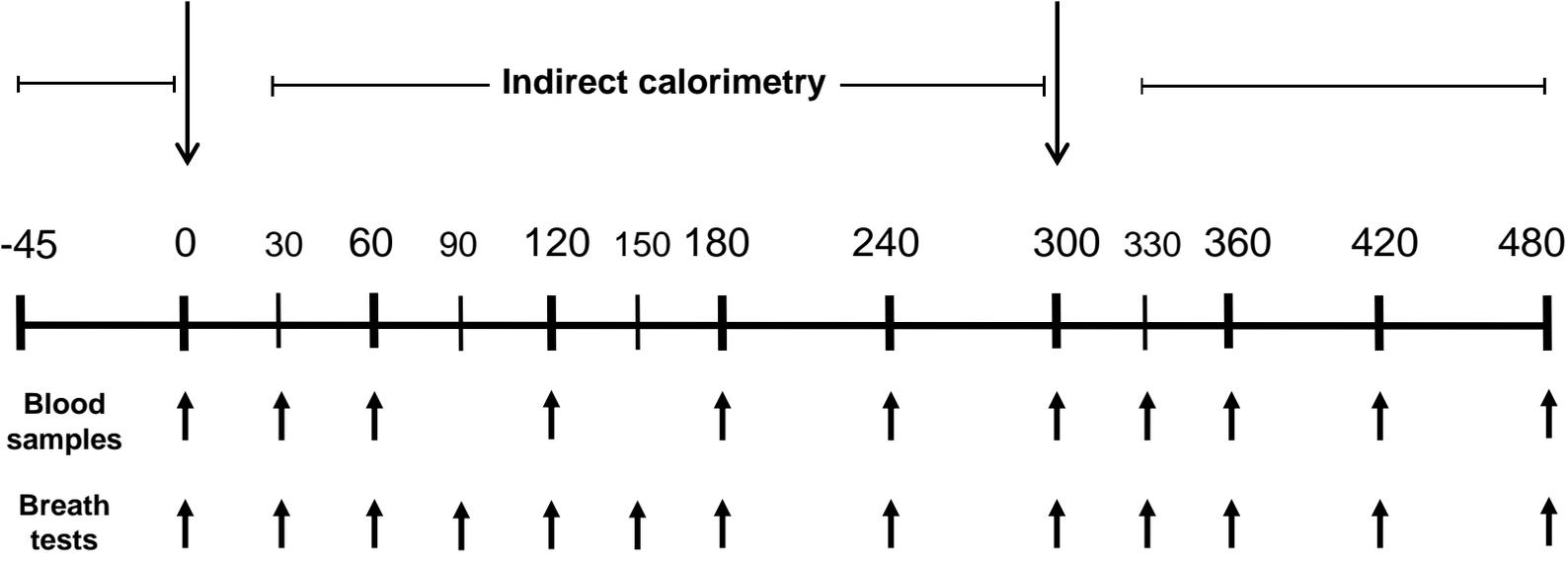
**9 normal weight subjects
9 obese subjects**



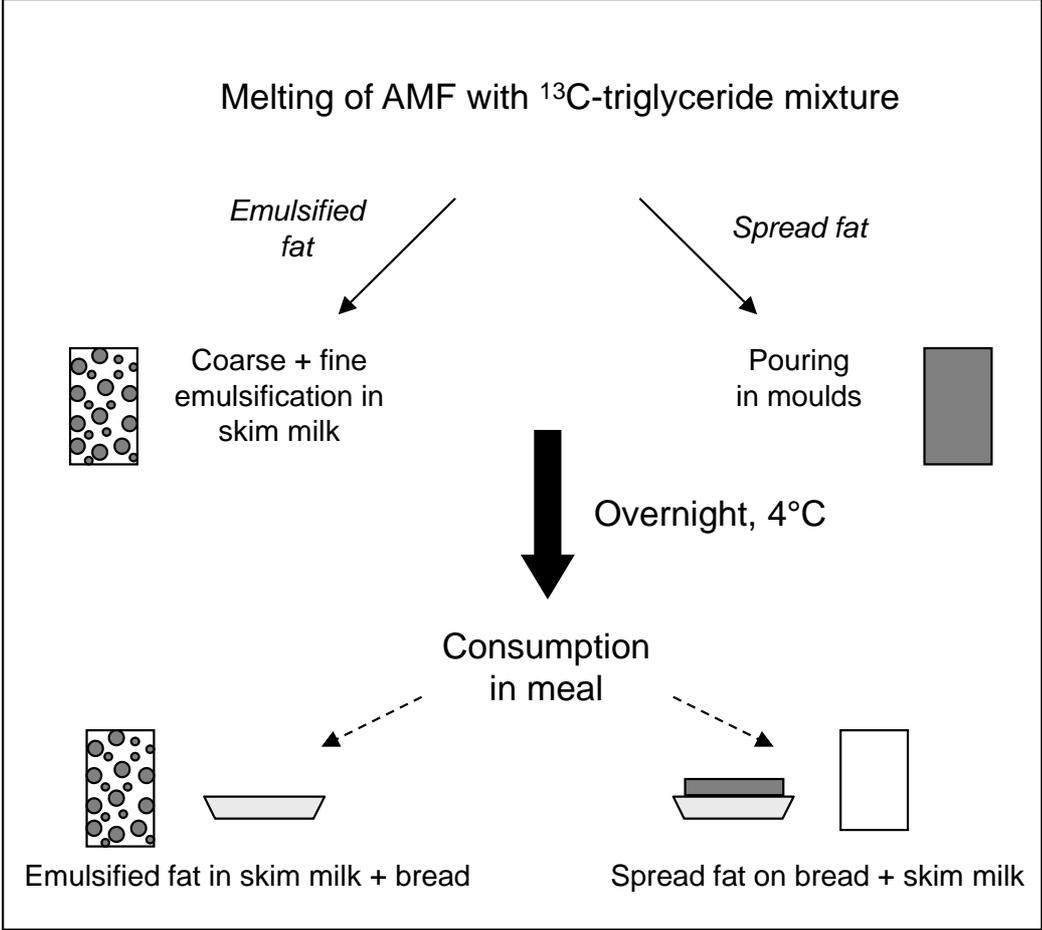
B

**Breakfast test
with ¹³C TAG**

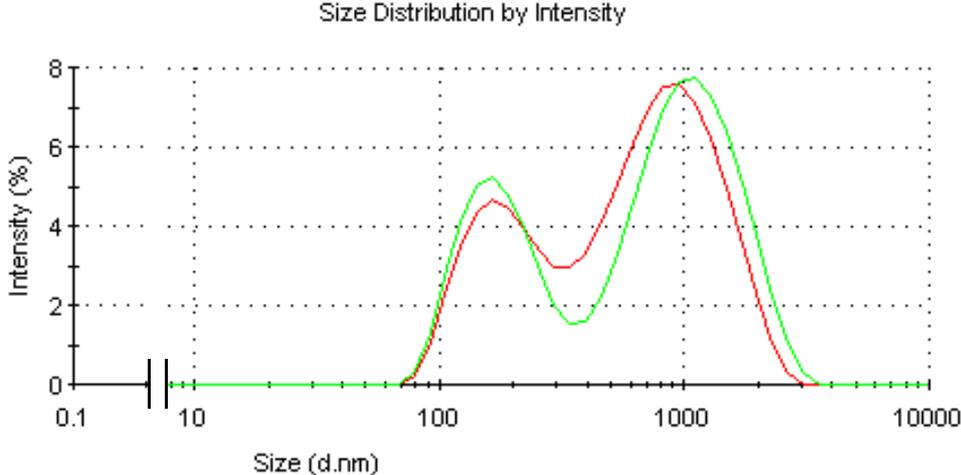
Lunch



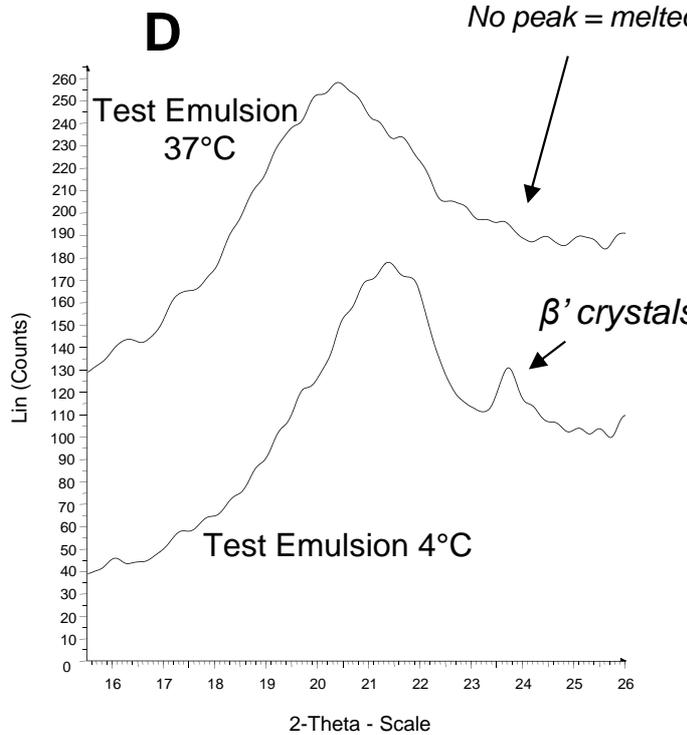
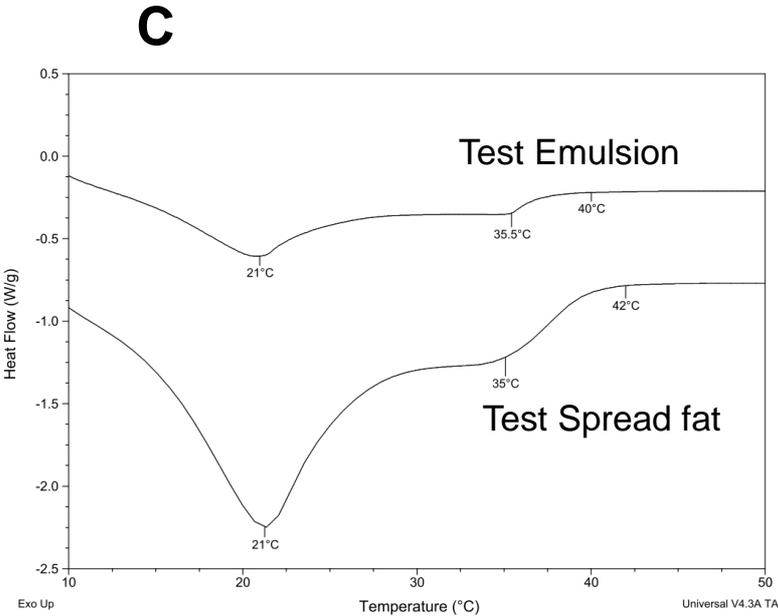
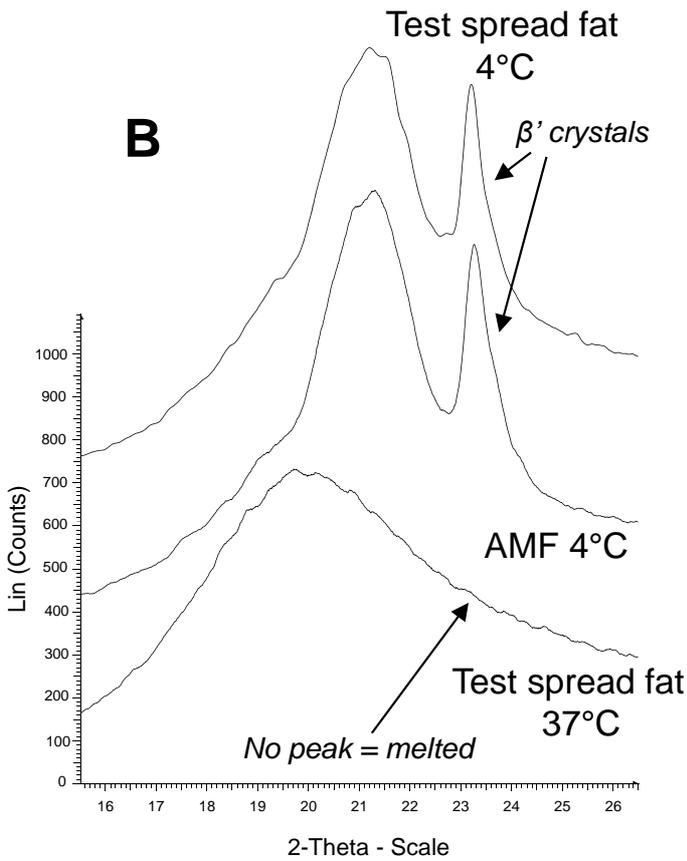
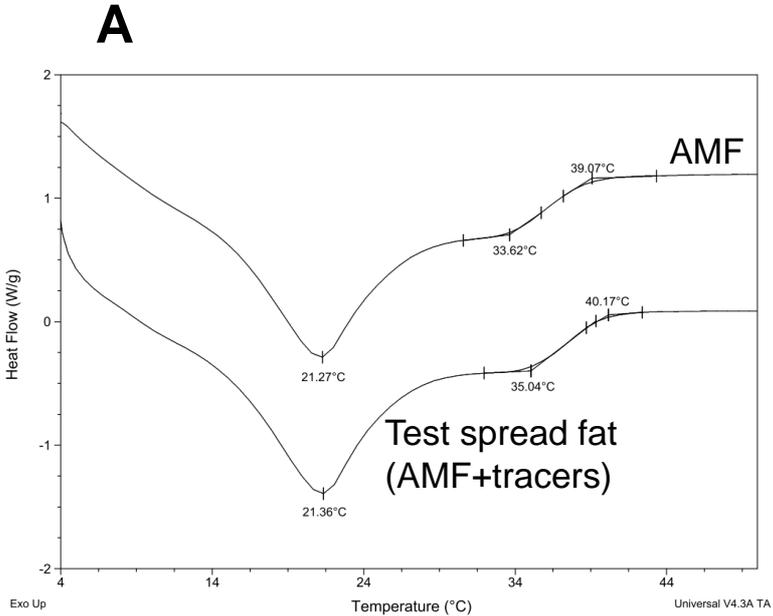
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



1.2.3. Discussion

La digestion d'une quantité accrue de matière grasse s'est révélée être altérée chez l'obèse, avec un retard important dans l'initiation de la digestion et une accumulation de TG participant alors au maintien d'une lipémie élevée et prolongée (cf. Chap.4, § 1.1.3), phénomène reconnu comme facteur de risque d'athérosclérose (Chapman *et al.* 2011; Nordestgaard *et al.* 2007). Compte tenu de l'importance, chez les sujets obèses, du fléchage métabolique des acides gras vers le tissu adipeux pour y être stockés après un repas gras, une modulation possible de la cinétique d'hypertriglycémie postprandiale et de ses conséquences métaboliques (stockage vs β -oxydation) mérite un intérêt tout particulier. Nous avons ainsi choisi d'évaluer l'impact de la structure de la matière grasse dans un repas mixte sur le métabolisme global des lipides, depuis la quantité et la taille des chylomicrons sécrétés jusqu'à l'étape finale de β -oxydation, en incluant la perte fécale. Pour cela, des petits-déjeuners tests à base de 40 g de matière grasse (marquée au carbone 13), soit émulsionnée soit tartinée (non-émulsionnée), ont été consommés par des sujets normo-pondérés et obèses.

Les petits-déjeuners ont été conçus de manière à ce que seule la structure de la MG soit différente. Ils étaient donc iso-caloriques et de même composition macro-nutritionnelle (**table 1** dans article). Les facteurs couramment étudiés comme le profil en AG ou la teneur en protéines ne peuvent donc pas être impliqués dans les différences de métabolisation des lipides observées, uniquement dues, ici, à la structure physico-chimique des lipides dans le repas (**table 1** dans article).

Le profil de cinétique des TG des fractions riches en chylomicrons suite à la consommation de l'émulsion s'avère différent de celui obtenu pour la forme tartinée, présentant un pic plus précoce et plus prononcé mais aussi plus rapidement éliminé, en particulier chez les obèses. Nos données, obtenues avec un repas réaliste, sont donc cohérentes avec celles rapportant une absorption facilitée des AG lorsqu'un simple bolus d'huile végétale est émulsionné, observée à la fois chez l'Homme (Garaiova *et al.* 2007) et chez le rongeur (Michalski *et al.* 2005; Laugerette *et al.* 2011; Keogh *et al.* 2011). De tels résultats peuvent s'expliquer par le fait que, par rapport à la forme brute (tartinée), l'émulsion utilisée dans notre étude représente une surface de matière grasse disponible pour les lipases environ 70 000 fois plus importante que celle représentée par la MG tartinée, ce qui facilite d'autant plus la lipolyse et, par conséquent, stimule aussi davantage l'absorption (Delorme *et al.* 2011). Ainsi, Armand et ses collaborateurs ont montré que des émulsions entérales, dont la taille de gouttelettes différait (~1 vs ~10 μ m), induisaient des cinétiques de lipémie très

similaires (Armand *et al.* 1999). Les différences marquées que nous observons dans la présente étude sont donc le résultat de la digestion de deux structures de MG très différentes : l'une non-émulsionnée (tartinée) et l'autre émulsionnée finement avec des gouttelettes proches du micron. Notre étude apporte ainsi une preuve de concept que de tels effets peuvent être observés dans le cas d'un repas mixte, alors que les études précédentes employaient une huile seule, parfois même donnée en intra-gastrique directement.

Au sujet de l'agent émulsifiant, la matière grasse a ici été émulsionnée grâce à l'action d'émulsifiants naturels tels que les protéines laitières du lait écrémé principalement, mais aussi les phospholipides, mono- et diglycérides de la MG laitière résiduelle du lait écrémé, conférant à l'émulsion une certaine stabilité en conditions gastriques (cf. Chap.1, § 3.1.2.c). Il a récemment été reporté que des émulsions stabilisées par des caséines et des monoglycérides induisaient une plus faible lipémie que des émulsions à base de lécithine, chez des hommes non obèses (Keogh *et al.* 2011) et nous avons montré que la lipolyse *in vitro* était davantage induite lorsque des émulsions étaient stabilisées avec de la lécithine plutôt qu'avec des caséines (Vors *et al.* 2012). Compte tenu du fait que le métabolisme des obèses est davantage affecté par la forme émulsionnée ou non de la MG, de nouvelles études devraient se pencher sur l'effet métabolique de différents émulsifiants chez ce genre d'individus. Enfin, l'importance de l'exposition au goût du gras sur le métabolisme lipidique a été récemment mise en évidence (Mattes 2002 ; Mattes 2009). Nous ne pouvons donc pas exclure une contribution éventuelle de différences de perception orale entre les petits-déjeuners sur les différences de lipémie postprandiale observées.

Un niveau de lipoprotéines riches en TG maintenu élevé en période postprandiale, dû en partie à une mauvaise clairance des chylomicrons et de leurs remnants, est reconnu comme un facteur de risque indépendant de maladies cardiovasculaires (Chapman *et al.* 2011; Nordestgaard *et al.* 2007). Ainsi, en situation postprandiale, il serait préférable de présenter des pics de lipémie rapidement éliminés, plutôt qu'une lipémie en constante augmentation et maintenue élevée (Lopez-Miranda *et al.* 2007). Notre étude montre alors pour la première fois que les cycles de variations de lipémie postprandiale peuvent être modulés par la structure de la MG dans le repas, chez des sujets normo-pondérés et obèses. De manière intéressante, on relève chez les obèses un réel délai ou retard à l'augmentation des TG de la FRCM suite à la consommation de la tartine. Un tel métabolisme des LRT retardé a également été observé chez des sujets en surpoids par comparaison à des sujets de poids normal, après une charge orale en lipides (Nabeno-Kaeriyama *et al.* 2010). Les différences de lipémie observées chez

les obèses entre les deux petits-déjeuners peuvent s'expliquer par une sécrétion pancréatique diminuée chez ces individus, comme observé précédemment en réponse à un repas liquide riche en lipides et associé à une faible vidange de la vésicule biliaire (Wisén *et al.* 1992). On comprend ainsi qu'avec moins de lipases pancréatiques, les obèses sont capables d'hydrolyser davantage une matière grasse pré-émulsionnée plutôt que la même quantité de matière grasse non-émulsionnée au départ, et ce malgré une vidange gastrique finalement ralentie lors de la digestion d'une émulsion (Armand *et al.* 1999).

Par ailleurs, suite au second repas (servi au bout de 5 heures après le petit-déjeuner), une augmentation de la concentration plasmatique en AG marqués au ^{13}C apparaît, avec un pic caractéristique à 360 minutes. Ce phénomène, appelé «effet second repas», est connu comme étant la contribution des lipides ingérés lors d'un premier repas à la lipémie apparaissant après le second repas. Dans le cas des sujets obèses, compte tenu du retard à la digestion pris suite à la consommation de la tartine, les lipides sanguins provenant de l'absorption de la matière grasse tartinée se sont alors cumulés à ceux générés par le second repas, provoquant alors une lipémie élevée et maintenue ainsi jusqu'à la fin du test. En revanche, il est important de noter que les obèses ne présentent aucun défaut à la digestion de la matière grasse émulsionnée au vu des cinétiques de lipémie et de suivi plasmatique des traceurs, et du retour à des valeurs normales en fin de test. Ainsi, chez des individus obèses, on retiendra que la consommation d'une ou l'autre des deux structures de MG au petit-déjeuner semble influencer le profil lipidique global de la journée.

Concernant les particules de la FRCM, à l'origine des différences de lipémie observées, nous avons relevé une augmentation rapide du taux de TG de la FRCM suite à la consommation de l'émulsion chez les normo-pondérés, correspondant transitoirement à une augmentation du nombre de particules comme le révèle la similitude des tailles de particules sécrétées (entre émulsion et tartine), associée à une augmentation du taux d'ApoB48 à 120 minutes avec l'émulsion. En revanche, chez les obèses, les concentrations plasmatiques en ApoB48 sont restées globalement les mêmes suite à la digestion des deux structures de MG, indiquant que l'augmentation de lipémie après l'émulsion n'était pas due à une augmentation du nombre de particules mais à une augmentation de leur taille, confirmée par les mesures granulométriques.

Il faut également souligner que les quelques études portant sur les effets de la structure émulsionnée ont jusqu'à présent caractérisé uniquement la lipémie postprandiale ou les concentrations plasmatiques en AG, sans aller au-delà dans l'étude du métabolisme lipidique.

Pour la première fois, à l'aide d'un protocole incluant la perte fécale et le devenir métabolique des lipides, nous montrons que l'émulsification de la MG affecte significativement l'orientation métabolique des lipides exogènes, en l'occurrence en faveur d'une β -oxydation. L'apparition précoce de ^{13}C dans l'air expiré que nous observons est due à la oxydation rapide des acides gras courts et moyens de la matière grasse laitière testée ; de tels acides gras sont en effet directement absorbés pour être oxydés au niveau du foie (cf. Chap.1, § 3.2). Suite à un apport lipidique ponctuel (comme dans notre étude), l'oxydation lipidique a été reportée fortement diminuée chez des sujets obèses par certains auteurs (Binnert *et al.* 1998) tandis que d'autres la retrouve augmentée chez ce type d'individus (Hodson *et al.* 2010). Notre étude montre, quant à elle, que l'oxydation des acides gras exogènes peut être augmentée chez l'obèse *via* l'émulsification de la matière grasse ingérée. Nous nous sommes donc intéressés de plus près aux repas tests des deux précédentes études (Binnert *et al.* 1998; Hodson *et al.* 2010) et ainsi rendu compte que leurs données peuvent également être expliquées par la structure d'apport lipidique, non considérée par les auteurs. En effet, Binnert et ses collaborateurs trouvent une moindre oxydation des lipides exogènes chez les obèses par comparaison aux normo-pondérés suite à l'ingestion d'un bolus d'huile tandis que Hodson et ses collaborateurs démontrent une oxydation augmentée chez l'obèse après avoir dispersé leur matière grasse test et leur traceur lipidique sous forme d'émulsion.

L'effet observé de l'émulsification de la matière grasse sur l'oxydation des lipides exogènes dans notre étude ne peut être dû à des différences d'absorption intestinale puisque la perte fécale est globalement similaire entre les groupes de sujets et entre les petits-déjeuners. En revanche, l'oxydation lipidique totale n'est pas modifiée par la structure de la MG. La source d'AG beta-oxydés est néanmoins différente : avec l'émulsion, les AG exogènes ingérés au petit-déjeuner sont préférentiellement beta-oxydés tandis qu'avec la forme tartinée, davantage d'AG endogènes et/ou exogènes provenant du second repas ont été beta-oxydés, de sorte que les AG exogènes du petit-déjeuner ont davantage été orientés vers des voies de stockage. Ces résultats sont cohérents avec l'obtention d'un spillover apparent plus important deux heures après la consommation de l'émulsion, dans les deux groupes, par comparaison à la tartine ; ce spillover peut s'expliquer par une meilleure absorption intestinale des lipides émulsionnés, résultant en une lipolyse des chylomicrons plus précoce qui génère alors des AG circulants d'origine exogène. Cet apport précoce et important d'AGNE circulants exogènes sert alors de substrat aux différents tissus périphériques et explique, dans le cas de l'émulsion,

la contribution plus importante des AG exogènes à l'oxydation lipidique totale, dans les deux groupes.

Par ailleurs, des études récentes préconisent l'émulsification des lipides afin d'assurer une meilleure bioaccessibilité et une meilleure absorption intestinale des acides gras indispensables, pouvant ainsi être apportés en quantités similaires à celles recommandées. Cependant, au vu de nos présents résultats, il est important de souligner le risque que de tels AG soient facilement absorbés puis « perdus » par β -oxydation, au lieu d'être biodisponible pour le renouvellement des AG des phospholipides membranaires. Des études complémentaires devront être menées afin d'étudier l'impact de la structuration d'huiles riches en AGPI indispensables sur le devenir métabolique postprandial de ces AG spécifiques.

1.3. Etude *in vitro* de la modulation de la digestion et de l'absorption entérocytaire des lipides par différentes structures émulsionnées

1.3.1. Introduction

Nos travaux et ceux d'autres équipes ont montré que la structure des lipides (notamment émulsionnée) dans les aliments gras est de nature à moduler l'absorption lipidique, les caractéristiques des chylomicrons et le devenir des lipides chez l'Homme. Il nous a alors paru important de comprendre plus en détail l'effet de la structure émulsionnée et d'approfondir les connaissances quant aux étapes consécutives de lipolyse et d'absorption. En effet, si les émulsions ont fait l'objet d'études *in vitro* quant à leur stabilité et à leur devenir en conditions gastro-intestinales, aucun modèle n'inclut les deux étapes de digestion et d'absorption pour comparer des structures émulsionnées différentes. De plus, le rôle de la lipolyse gastro-intestinale dans les études de biodisponibilité est presque toujours négligé par rapport à l'étape d'absorption intestinale alors que celle-ci peut être très dépendante de la spécificité de substrat des enzymes lipolytiques et de la nature des produits de lipolyse générés. L'impact de la structure des lipides au travers de repas « solide-liquide » ou « liquide émulsionné » sur la vitesse de lipolyse en conditions gastrique et intestinale a déjà été montré *in vivo* et *in vitro*, avec une bonne corrélation (Carriere *et al.* 2000; Carriere *et al.* 2001). Avant d'explorer les effets potentiels de différentes structures émulsionnées chez l'Homme où les protocoles sont lourds à mettre en place et très coûteux, nous avons choisi d'élaborer un modèle complet *in vitro* de digestion et d'absorption lipidiques, en collaboration avec deux autres laboratoires français (TREFLE à Bordeaux et EIPL à Marseille). Notre stratégie a donc été de formuler

des émulsions alimentaires modèles différant par la qualité de l'huile dispersée (fraction oléique de matière grasse laitière *vs* huile de colza) et de l'agent émulsifiant (lécithine de soja *vs* caséinate) et de les soumettre à une lipolyse *in vitro* simulant d'abord la phase gastrique, puis la phase intestinale (**figure 20**). La cinétique d'apparition des produits de lipolyse et leur composition ont été suivies. Les produits de lipolyse ont ensuite été mis en contact avec des cellules Caco-2, pour caractériser la cinétique d'absorption des lipides et les propriétés des lipoprotéines sécrétées (**figure 20**).

1.3.2. Article

Cite this: DOI: 10.1039/c2fo10248j

www.rsc.org/foodfunction

PAPER

Coupling *in vitro* gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions

Cécile Vors,^{ab} Perrine Capolino,^{cd} Clémence Guérin,^{cd} Emmanuelle Meugnier,^b Sandra Pesenti,^b Marie-Agnès Chauvin,^b Julien Monteil,^e Noël Peretti,^{af} Maud Cansell,^e Frédéric Carrière^c and Marie-Caroline Michalski^{*ab}

Received 9th November 2011, Accepted 18th January 2012

DOI: 10.1039/c2fo10248j

There is a growing interest in the optimization of dietary emulsions for monitoring postprandial lipid metabolism in the frame of preventing metabolic diseases. Using various emulsions, we investigated in a systematic scheme the combination of (i) *in vitro* gastrointestinal lipolysis and (ii) absorption and metabolism of lipolysis media in Caco-2 cells. Four emulsions based on either milk fat olein (OL) or rapeseed oil (RA) as the dispersed phase and either lecithin (LE) or sodium caseinate (CA) as the emulsifier were tested. After a sequential incubation of these emulsions with gastric and pancreatic enzymes, lipolysis media were incubated with Caco-2 cells, after dilution (1 : 20) to maintain the barrier integrity. Both gastric and duodenal lipolysis levels were similar to values reported *in vivo* and the rates of lipolysis were higher with LE-stabilized emulsions than with CA-stabilized emulsions ($P < 0.05$). TAG secretion by Caco-2 cells was found to be higher using (i) duodenal *vs.* gastric media ($P < 0.001$) and (ii) emulsions stabilized with CA *vs.* LE ($P < 0.01$). Consistently, gene expression of both FABP2 and FATP4 induced by the duodenal media was (i) higher than that with gastric media ($P < 0.001$) and (ii) faster than that with model mixed micelles. Using gastric media, TAG secretion of Caco-2 cells after 12 h was higher with RA than with OL ($P < 0.001$). Moreover, the RA–CA emulsion increased the size of secreted lipoprotein particles (514 nm *vs.* 61 to 130 nm; $P < 0.01$). In conclusion, it was possible to observe distinct responses in the lipid metabolism of Caco-2 cells incubated with lipolysis media obtained from different dietary emulsions digested by gastrointestinal lipases *in vitro*.

Introduction

Obesity, diabetes and atherosclerosis are diseases generally associated to a hyperlipidic diet and have become major public concerns. In this context, particularly in type 2 diabetes, a high postprandial hypertriglyceridemia increases the risk to develop cardiovascular diseases. High fat diets are therefore not recommended. However, lipids are naturally occurring in numerous foodstuffs. They are also widely used as food ingredients because of their capacity to bring texture, flavour and taste. In this respect, oils and fats exist under various forms and structures in food products. In particular, dietary lipids, mainly found as

triacylglycerols (TAG), can be present as oil-in-water emulsions with different droplet sizes and stabilized by different surfactant types (phospholipids, proteins, *etc.*). Until recently, nutritional studies on dietary oils and fats only considered the impact of their global intake and their total fatty acid composition. The effect of their structure (*e.g.*, fatty acid position on the glycerol backbone) and/or their physical state (emulsified or not, droplet size, *etc.*) remained poorly described. Because of their relevance, these parameters are now a subject of growing research interest.^{1–6} In rats, Michalski *et al.* report that the emulsified structure influences the overall fat metabolism kinetics including lipolysis, absorption and oxidation steps.^{7,8} Similar observations were recently reported in humans.⁹ Some studies have shown, in healthy subjects and type 2 diabetics, differences in postprandial triglyceridemia after ingestion of butter, milk and cheese.^{10–12} In rats and in humans, increased fatty acid bioavailability was observed using oil-in-water emulsions.^{6,13} Moreover, in humans, the fatty acid composition and the emulsion droplet size affect chylomicron size and lipemia kinetics, respectively.^{14,15}

Therefore, it now becomes important to better understand the effect of emulsion structure on lipolysis and absorption steps, considering that little information is available about the effect of

^aINRA USC1235, CarMeN laboratory, INSA-Lyon, IMBL, Villeurbanne, F-69621, France. E-mail: marie-caroline.michalski@insa-lyon.fr; Fax: +33 4 72 43 85 24; Tel: +33 4 72 43 85 70

^bINSERM U1060, INRA USC1235, CarMeN laboratory, Lyon University, Univ Lyon-1, Oullins, F-69921, France

^cCNRS-Aix-Marseille Université-Enzymologie Interfaciale et Physiologie de la Lipolyse, UMR 7282, Marseille, F-13402, France

^dGERME S.A., Marseille, F-13014, France

^eUniv. Bordeaux, Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets (CBMN), CNRS, UMR 5248, IPB, F-33600 Pessac, France

^fHospices Civils de Lyon, CRNH-RA, CENS, Lyon, F-69008, France

1.3.3. Discussion

Rappelons que les objectifs de cette étude complémentaire *in vitro* étaient (i) d'étudier l'influence de la structure physique (deux types d'émulsions) de deux sources lipidiques aux profils en AG différents sur les cinétiques de lipolyses gastrique et duodénale et, (ii) en utilisant le modèle des Caco-2, d'évaluer l'absorption intestinale et le métabolisme lipidique des produits de lipolyse, afin de vérifier la faisabilité technique d'un tel modèle et d'en soulever les limites éventuelles.

Lipolyse des émulsions

La nature de l'agent émulsifiant semble avoir un effet significatif sur les taux de lipolyses. En effet, nous avons relevé des taux de lipolyses gastrique et duodénale plus élevés pour les émulsions stabilisées avec de la lécithine de soja, par comparaison aux émulsions stabilisées avec du caséinate. Ces émulsions à base de lécithine seraient ainsi de meilleurs substrats pour les lipases ; on notera que leurs surfaces interfaciales tendent justement à être plus élevées, pouvant ainsi augmenter l'activité lipolytique. Ce premier résultat est cohérent avec une étude précédente montrant que des émulsions huile-dans-eau stabilisées avec de la lécithine résultaient en une lipolyse pancréatique quelque peu augmentée comparée à celle obtenue avec des émulsions à base de caséines, dans un modèle *in vitro* dépourvu de lipase gastrique (Hu *et al.* 2010). Nous trouvons ainsi des différences de lipolyse (en termes de % d'AG libres générés) plus marquées entre émulsions compte tenu de l'utilisation d'un modèle séquentiel, plus réaliste, incluant les étapes gastrique et intestinale. De plus, il est important de noter que les émulsions classiques sont de pauvres substrats pour la lipase pancréatique, censée agir sur des produits de digestion déjà pré-lipolysés par la lipase gastrique ; l'action préalable de la lipase gastrique est essentielle pour promouvoir la suite de la lipolyse (Gargouri *et al.* 1986; Bernbäck *et al.* 1989). Les différences de lipolyse que nous observons doivent donc dépendre fortement de l'effet des agents émulsifiants sur l'activité de la lipase gastrique. Celle-ci serait dépendante de la nature des émulsifiants et il s'avère que les lécithines seraient capables d'augmenter la lipolyse des triglycérides par la lipase gastrique (Gargouri *et al.* 1986). Enfin, une stimulation augmentée de la lipolyse par la lécithine comparée aux caséines supporte les données d'une étude clinique récente, où des taux plus élevés de TG plasmatiques ont été observés suite à la consommation d'une émulsion stabilisée par de la lécithine d'œuf, par comparaison à ceux obtenus après consommation d'une émulsion stabilisée par des caséines et des monoglycérides (Keogh *et al.* 2011).

A l'inverse de l'effet de la nature de l'émulsifiant, nous n'avons pas observé d'effet significatif de la composition en AG de la MG émulsionnée sur les cinétiques de lipolyses. Ce second résultat est différent de ceux reportés par certaines études, indiquant une spécificité plus importante de la lipase pancréatique de porc (utilisée dans notre étude) envers les TG à chaîne moyenne par rapport aux TG à chaîne longue (Bonnet *et al.* 2009). Cela confirme, toutefois, que les lipases gastrique et pancréatique humaines peuvent lipolyser des chaînes d'AG moyennes et longues de manière similaire (Gargouri *et al.* 1986).

Dans les milieux de lipolyse finalement incubés (après dilution au 1/20) sur les cellules Caco-2, les concentrations en AG libres et monoglycérides étaient du même ordre de grandeur que celles couramment utilisées dans des micelles mixtes modèles (Salvini *et al.* 2002). Néanmoins, les milieux de lipolyse obtenus ici, en conditions mimant une réelle digestion, contiennent également des TG et des diglycérides ainsi que d'autres composants de jus gastrique et pancréatique. La composition de nos milieux de lipolyse était donc plus réaliste que celle des micelles mixtes modèles utilisées régulièrement afin de mimer des conditions physiologiques.

Enfin, il est important de noter que d'autres paramètres des étapes lipolytiques obtenus à l'aide de notre modèle étaient très similaires à ceux observés en conditions réelles chez l'Homme. Les taux de lipolyse gastrique obtenus au bout de 29 min (4 à 8,4 %) pour l'ensemble des émulsions testées étaient significatifs et semblables à ceux relatés *in vivo* au cours de la digestion d'un repas test (Carriere *et al.* 1993; Carriere *et al.* 2000; Carriere *et al.* 2005). De plus, le taux de lipolyse observé en phase duodénale dans notre modèle *in vitro* est proche de celui observé *in vivo* chez des hommes après consommation d'une émulsion grossière (10 μm) stabilisée avec des protéines laitières et de la lécithine de soja (Armand *et al.* 1999). Concernant les produits de lipolyse, les concentrations en AG libres générés dans notre modèle (5-20 mmol/L) sont similaires à celles reportées par plusieurs études chez l'Homme (Borgstrom *et al.* 1957; Hernell *et al.* 1990; Carriere *et al.* 1993; Armand *et al.* 1999) et les concentrations en di- et mono-glycérides comparables à celles retrouvées dans des fluides duodénaux après digestion d'une émulsion grossière (10 μm ; Armand *et al.* 1999).

Sécrétion lipidique et expressions géniques des cellules Caco-2 après incubation avec des milieux de lipolyses gastrique et duodénale

Nous avons relevé une sécrétion de TG par les Caco-2 d'environ 10 μ M après seulement 4 heures d'incubation avec des milieux de lipolyse duodénale, concentration retrouvée dans la littérature après 24 heures d'incubation avec des micelles mixtes modèles à base de lyso-PC. De plus, cette concentration est supérieure à celle obtenue après une nuit d'incubation avec des micelles mixtes à base d'acide oléique et de taurocholate (Luchoomun *et al.* 1999). Nos milieux de lipolyse, plus complexes et plus réalistes que des micelles mixtes, semblent donc être capables de mieux stimuler l'absorption intestinale. La phosphatidylcholine est connue pour promouvoir la sécrétion de TG par des cellules Caco-2 lorsqu'elle est incorporée à des micelles mixtes à base d'acide oléique et de taurocholate (Mathur *et al.* 1996; Karpf *et al.* 2006). Cependant, dans notre étude, les émulsions à base de caséinate ont davantage stimulé la sécrétion lipidique des cellules intestinales au bout de 4 heures que celles à base de lécithine, même si les milieux de lipolyse issus de la digestion des émulsions à base de caséines contenaient moins d'AG libres que ceux obtenus des émulsions à base de lécithine. La digestion de caséines peut générer des peptides bioactifs connus pour activer certaines fonctions métaboliques des Caco-2 (cf. article) ; nous ne pouvons donc pas exclure l'impact potentiel de ces produits dérivés de digestion sur l'augmentation de sécrétion lipidique observée dans notre modèle.

Par ailleurs, l'incubation des cellules Caco-2 avec des milieux de lipolyse duodénale a provoqué une augmentation de l'expression génique des transporteurs d'acides gras, FATP4 et FABP2, par comparaison aux micelles mixtes modèles, ce qui n'est pas le cas pour le gène MTP impliqué dans la formation des chylomicrons (cf. Chap.1, § 3.2.2). Il a été mis en évidence que l'acide palmitique régulaît négativement l'expression de la MTP dans les cellules Caco-2 par rapport à l'acide oléique ou à l'absence de lipides (Bateman *et al.* 2007). Il a alors été suggéré que les TG riches en acide oléique avaient de meilleures capacités à former des gouttelettes lipidiques stables que les TG riches en acides palmitique, ce qui est un élément clé dans le processus d'expansion du noyau lipidique des chylomicrons dans les entérocytes (Bateman *et al.* 2007). Ainsi, dans le cas de notre étude, les cellules Caco-2 ont été exposées à des profils lipidiques complexes (cf. composition en AG des matières grasses émulsionnées, Table 2) incluant de nombreux acides gras ; les données que nous avons obtenues sont donc le résultat d'un effet synergique des différents AG, ce qui peut expliquer l'absence d'une expression de MTP augmentée par rapport aux micelles mixtes modèles

d'acide oléique. L'induction des transporteurs a toutefois été suffisante pour induire l'augmentation de la sécrétion de TG observée suite à l'incubation de milieux duodénaux pendant 4 heures.

Comme tout modèle a ses limites, nous avons malheureusement été confrontés à la cytotoxicité des milieux de lipolyse incubés. Malgré une dilution au 1/20 de l'ensemble des milieux d'incubation, les milieux issus de la lipolyse duodénale (soit 30 min de lipolyse gastrique + 30 min de lipolyse pancréatique) se sont avérés toxiques pour les cellules Caco-2 (perte de la perméabilité membranaire) au-delà de 4 heures d'incubation. L'étude en cinétique de sécrétion lipidique a donc été réalisée uniquement avec les produits de lipolyse gastrique (29 min de digestion) ; notons alors que cette expérience est représentative d'une situation d'insuffisance pancréatique.

Sécrétion lipidique des cellules Caco-2 suite à différents temps d'incubation avec des milieux de lipolyse gastrique

Nous avons mesuré la sécrétion lipidique (TG) des cellules Caco-2 au bout de 4, 8 et 12 heures d'incubation avec des milieux de lipolyse gastrique, ainsi que la taille des lipoprotéines sécrétées au bout de 12 heures. L'huile de colza induit globalement une sécrétion lipidique plus élevée que l'oléine de matière grasse laitière, de manière cohérente avec son effet sur l'expression de FABP2. Jackson et ses collaborateurs ont mis en avant que l'incubation pendant 4 jours avec des micelles mixtes induisait une plus forte sécrétion de TG lorsque les micelles étaient à base d'acides gras monoinsaturés par comparaison avec des acides gras polyinsaturés ou saturés ; cette forte sécrétion provenait de la formation de plus grosses particules riches en TG, comme indiqué par un ratio TG/ApoB augmenté suite à l'incubation avec des micelles mixtes d'acides gras monoinsaturés et de taurocholate (Jackson *et al.* 2009). Ainsi, la sécrétion importante de TG observée dans notre étude avec les émulsions à base d'huile de colza peut être due au fait que l'huile de colza contient trois fois moins d'acide palmitique et deux fois plus d'acide oléique que la fraction oléique de matière grasse laitière. Par ailleurs, après 8 heures d'incubation, nous avons tout de même observé une augmentation brutale de sécrétion de TG dans le cas des émulsions à base d'oléine de MG laitière, pouvant s'expliquer en partie par l'effet stimulant des acides à chaînes courtes et moyennes (C10:0, C12:0 et C14:0) sur la captation lipidique et l'accumulation intracellulaire des acylglycérols (Tsuzuki 2007). Enfin, l'émulsion à base d'huile de colza stabilisée par des caséines est celle ayant la plus grande capacité à induire une sécrétion importante de TG (notamment via des

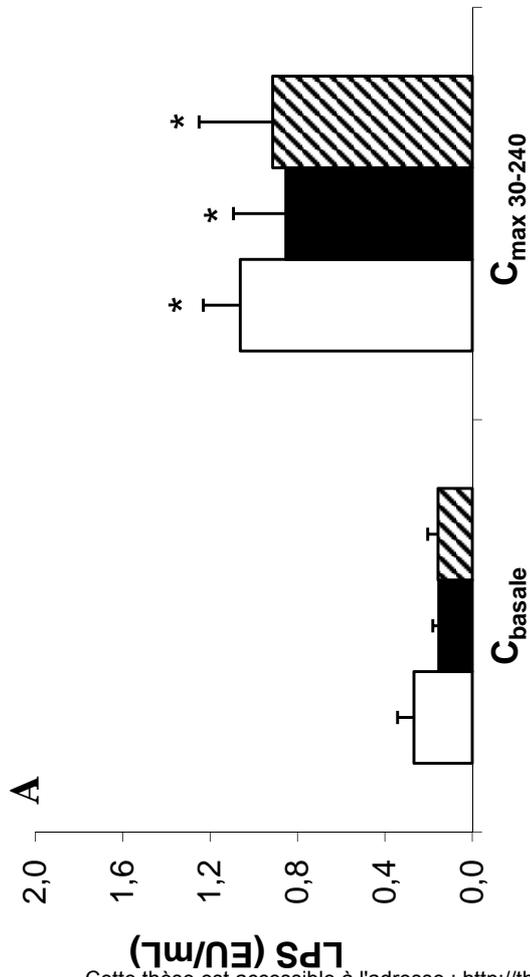
lipoprotéines de plus grande taille), aussi bien après une lipolyse gastrique que duodénale, et ce sans avoir subi une lipolyse des plus importantes.

Ainsi, les cellules Caco-2 étaient jusqu'alors employées pour l'étude de l'absorption lipidique avec l'utilisation de micelles mixtes modèles, le plus souvent à base d'un type d'acide gras et de taurocholate comme sel biliaire. Cependant, en conditions physiologiques, les micelles d'acides gras présentent une composition plus complexe, non reflétée par les micelles modèles couramment utilisées. De plus, avec l'émergence de nouvelles études démontrant l'impact de la structure physico-chimique et supramoléculaire des matières grasses sur leur digestion et leur absorption, le modèle des Caco-2 avec micelles mixtes n'était plus adapté et révélait alors ses limites. Nous montrons ici que l'incubation de milieux de lipolyse, réalisée préalablement *in vitro* sur des émulsions alimentaires, peut être réalisée sur cellules Caco-2 comme nouveau modèle pour tester la digestion et l'absorption d'émulsions de nature différente. Nous démontrons ainsi *via* ce nouveau modèle expérimental que la composition des émulsions influence l'activation du métabolisme lipidique ainsi que la sécrétion de TG correspondante.

Chapitre 4 – Résultats

2. ENDOTOXEMIE METABOLIQUE ASSOCIEE A L'ABSORPTION LIPIDIQUE

Normo-pondérés



Obèses

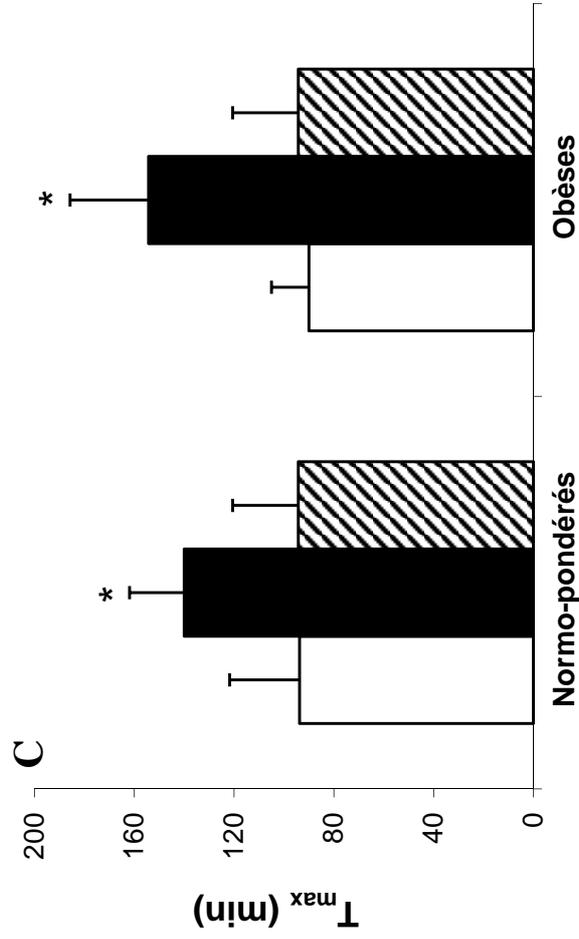
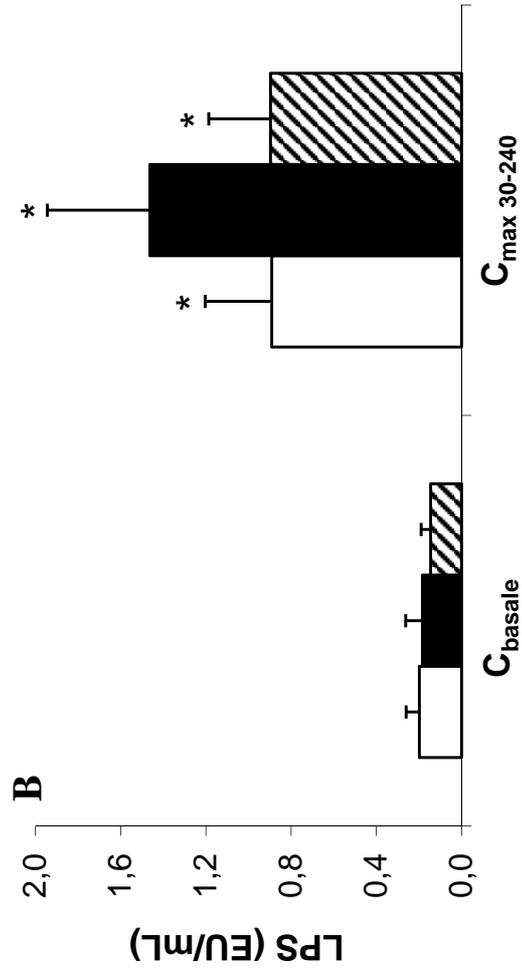


Figure 24. Paramètres de cinétique (C_{max} et T_{max}) après consommation de 10 g tartine (barres blanches), 40 g tartine (barres noires) ou 40 g émulsion (barre rayées) : concentrations en LPS, à jeun et maximale sur la période postprandiale 30-240 min, chez les normo-pondérés (A) et chez les obèses (B) ; temps d'apparition de la concentration maximale en LPS chez les deux groupes de sujets (C). Les données présentées sont des moyennes \pm ESM, n=8 par groupe. (A-B) * $P < 0.05$ comparé au basal (tests de Wilcoxon), (C) * $P < 0.05$ ANOVA univariée tous sujets, 40g tartine vs autres repas,

2.1. Endotoxémie au cours de l'absorption de différentes quantités et structures de lipides (étude Lipinflux)

2.1.1. Introduction

Au vu de la littérature, l'augmentation de la concentration plasmatique en endotoxines ou « endotoxémie métabolique » est étroitement liée à la consommation d'aliments peu équilibrés et notamment riches en lipides ; une endotoxémie élevée est également associée à l'obésité ou au diabète (cf. Chap.1, § 5.2). En raison des effets pro-inflammatoires avérés des LPS, l'endotoxémie métabolique est désormais considérée comme un facteur causal dans les complications métaboliques observées en cas d'obésité. Au regard des précédents résultats présentés dans ce manuscrit, et compte tenu de la modulation de la lipémie par la quantité ou la structure émulsionnée de la matière grasse ingérée, notamment chez les sujets obèses, nous nous sommes intéressés à savoir si l'endotoxémie métabolique associée à la digestion de différentes quantités ou structure de MG pouvait également être modifiée, d'autant plus que le rôle des chylomicrons dans le transport des LPS n'est plus à démontrer. Pour cela, tout au long de la digestion des 10 ou 40 g de MG tartinée et des 40 g de MG émulsionnée, nous avons mesuré l'endotoxémie plasmatique et calculé certains paramètres de cinétique correspondants (C_{max} , T_{max}). En outre, des dosages d'endotoxines ont également été réalisés sur les fractions riches en chylomicrons récupérées au cours de la première période postprandiale (0-300 min).

2.1.2. Résultats

Paramètres de cinétiques d'endotoxémie (C_{max} et T_{max}) suite aux différents repas tests

Suite aux mesures d'endotoxémie dans le plasma sanguin, après consommation de 10 g de matière grasse tartinée, 40 g tartinés ou 40 g en émulsion, les concentrations en LPS, à jeun et maximale sur la période postprandiale 30-240 min (C_{max}), ont été déterminées chez les normo-pondérés (**figure 24 A**) et chez les obèses (**figure 24 B**). Les temps d'apparition des concentrations maximales en LPS (T_{max}) dans les deux groupes de sujets sont également présentés (**figure 24 C**). Globalement, pour chaque groupe, on observe une endotoxémie transitoire en réponse aux différents repas ($C_{max} > C_{basale}$, $P < 0,05$). Ceci implique un taux de LPS circulants en phase postprandiale supérieur à celui observé à jeun. De plus, on constate

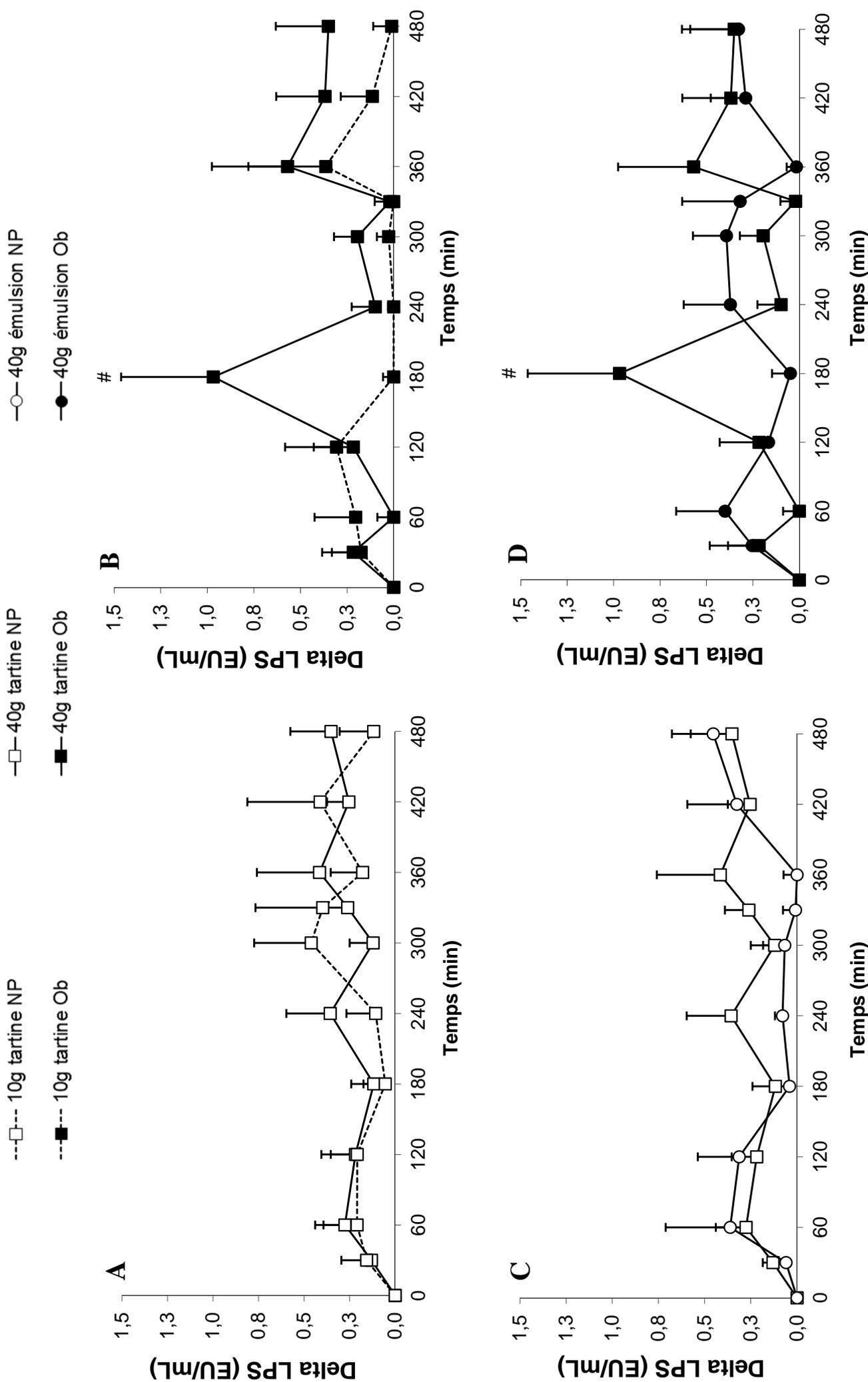


Figure 25. Cinétiques postprandiales d'endotoxémie, après consommation de 10 g tartine (carrés, lignes pointillées), 40 g tartine (carrés, lignes pleines), 40 g émulsion (ronds) chez les normo-pondérés (A, C) et chez les obèses (B, D). Les données présentées sont des moyennes \pm ESM, n=8 par groupe. (A-B) # $P < 0.1$ vs émulsion (tests de Wilcoxon).

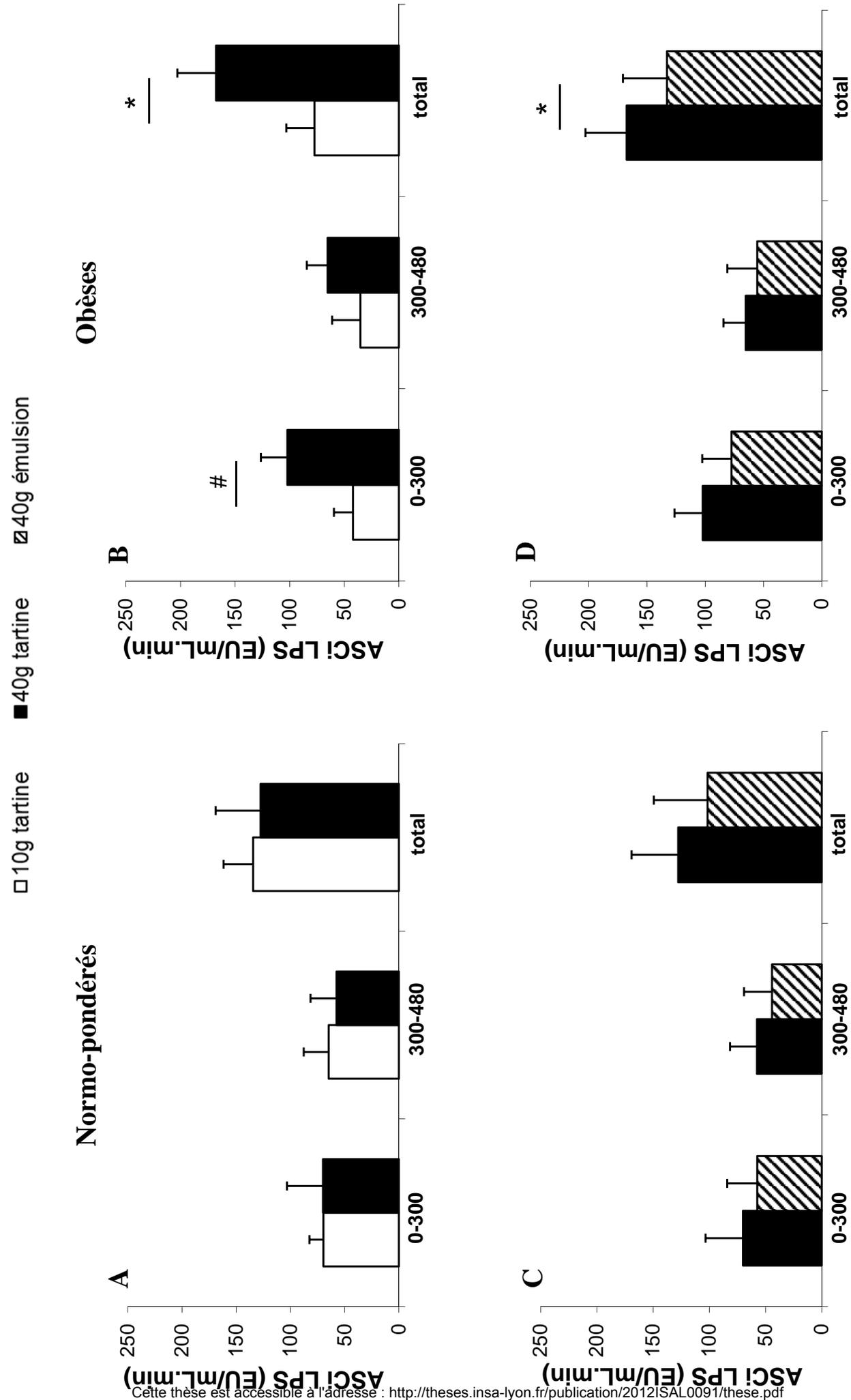


Figure 26. ASCI incrémentales des endotoxines, après consommation de 10 g tartine (barres blanches), 40 g tartine (barres noires), 40 g émulsion (barres rayées) ou 40 g émulsion (barres rayées) chez les normo-pondérés (A, C) et chez les obèses (B, D). Les données présentées sont des moyennes \pm ESM, $n=8$ par groupe. (B) # $P=0.1$ et * $P<0.05$ 40g vs 10g tartine (tests de Wilcoxon), (D) * $P<0.05$ 40g tartine vs 40g émulsion.

que le T_{\max} est plus long suite à la consommation des 40 g tartinés, comparé aux autres repas, dans les deux groupes de sujets ($P < 0,05$).

Cinétiques d'endotoxémie et ASCi correspondantes

Les cinétiques globales d'endotoxémie, dans les deux groupes, suite aux différents repas, sont présentées **figure 25**. Chez les normo-pondérés, ni la quantité, ni la structure de la matière grasse ingérée ne semblent affecter le profil des cinétiques d'endotoxémie postprandiale. Concernant les sujets obèses, un pic d'endotoxémie tend à apparaître, en moyenne, au bout de 180 minutes, suite à la consommation de 40 g de MG tartinée ($P < 0,1$).

En cumulé (ASCI en **figure 26**), nous n'observons pas de différence d'absorption de LPS, chez les sujets normo-pondérés, au cours des différentes phases postprandiales, selon la quantité ou la structure de la matière grasse ingérée (A-C). En revanche, les sujets obèses montrent, sur la journée (0-480 min), une absorption de LPS plus importante suite à 40 g de matière grasse tartinée comparé à 10 g ($P < 0,05$), et ce probablement dès le matin (0-300 min, $P < 0,1$; B). De plus, la consommation de 40 g de matière grasse émulsionnée entraîne, chez ces sujets, une baisse de l'accumulation d'endotoxines sur la journée, baisse légère mais significative ($P < 0,05$; D).

Teneur en endotoxines de la fraction riche en chylomicrons

Comme nous avons précédemment montré au laboratoire que les chylomicrons sont des transporteurs de LPS chez l'homme en période postprandiale, des dosages d'endotoxines ont été effectués sur la FRCM au bout de 60, 180, 240 et 300 minutes de digestion (**figure 27**), pour 5 sujets par groupe et pour chaque petit-déjeuner test. De la même manière que pour les LPS plasmatiques, la quantité et la structure de la matière grasse ingérée n'ont pas d'effet sur la charge en LPS de la FRCM, chez les normo-pondérés (A-C). Des tendances à une augmentation de la teneur en LPS de la FRCM entre 60 et 180 min sont observées pour les sujets obèses, lors de la consommation de 10 g ou 40 g de matière grasse tartinée ($P < 0,1$; B). De plus, suite à la consommation de l'émulsion par ces sujets, les particules de la FRCM présentent significativement plus de LPS, au bout de 60 min, comparé à la tartine avec 40 g de matière grasse. Il apparaît également, chez les obèses, une charge en LPS de la FRCM plus élevée dès 60 min, par rapport aux temps postprandiaux suivants ($P < 0,05$). Enfin, la teneur en LPS de la FRCM chez les obèses est variable en fonction de la structure (émulsionnée ou non) de la matière grasse ($P_{\text{repas}} = 0,01$) et ce, en fonction du temps ($P_{\text{tempsxrepas}} = 0,0003$).

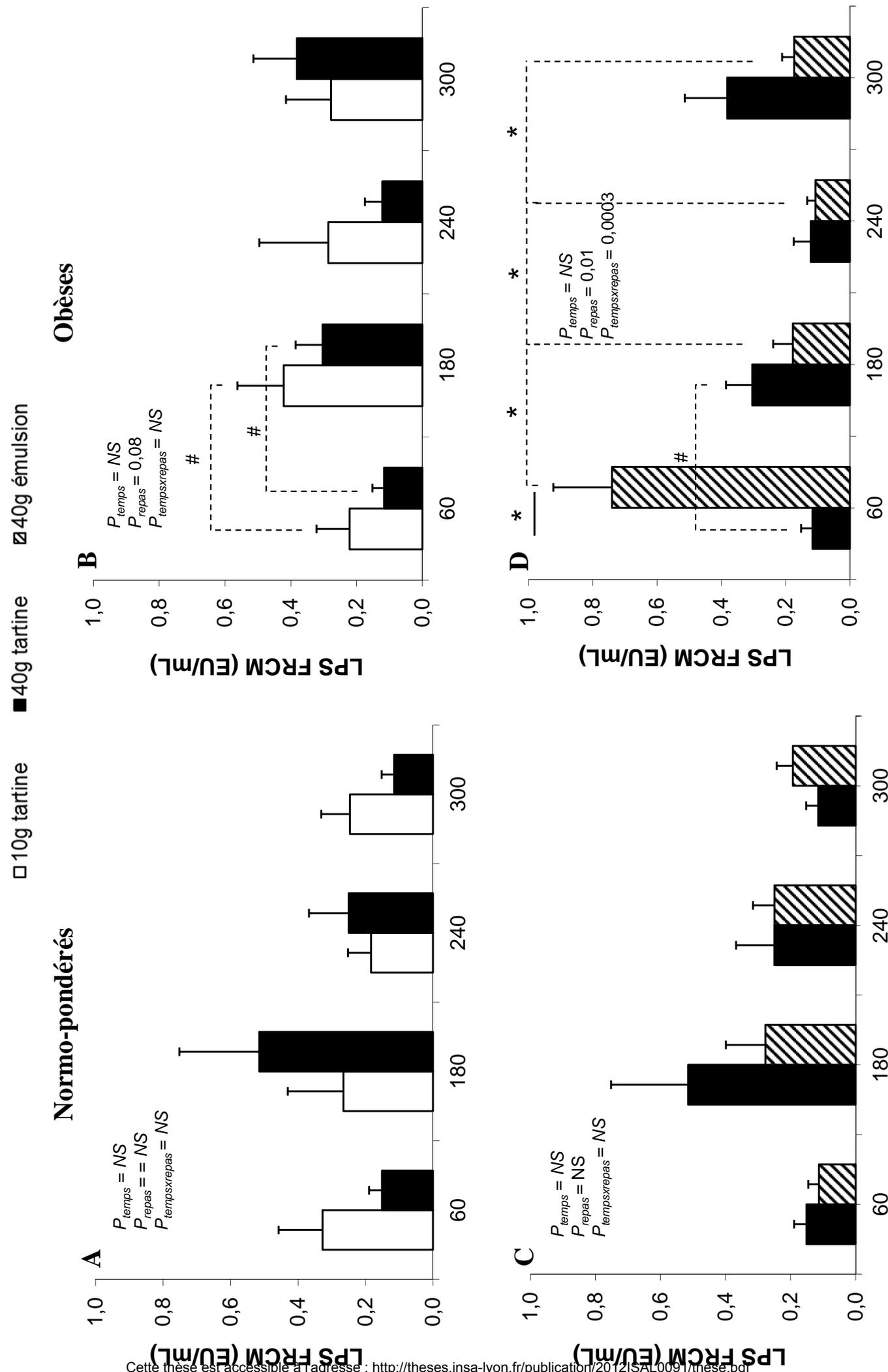


Figure 27. Teneur en endotoxines de la fraction riche en chylomicrons (FRCM) après consommation de 10 g tartine (barres blanches), 40 g tartine (barres noires) ou 40 g émulsion (barres rayées) chez les normo-pondérés (A, C) et chez les obèses (B, D). Les données présentées sont des moyennes \pm ESM, $n=5$ par groupe. (B) # $P \leq 0.1$ 60 min vs 180 min pour 10g et 40g tartine (tests t de Student appariés) ; (D) * $P < 0.05$ émulsion vs 40g tartine à 60min, émulsion vs 180min et # $P \leq 0.1$ 60 vs 180min pour 40g tartine (tests t de Student appariés).

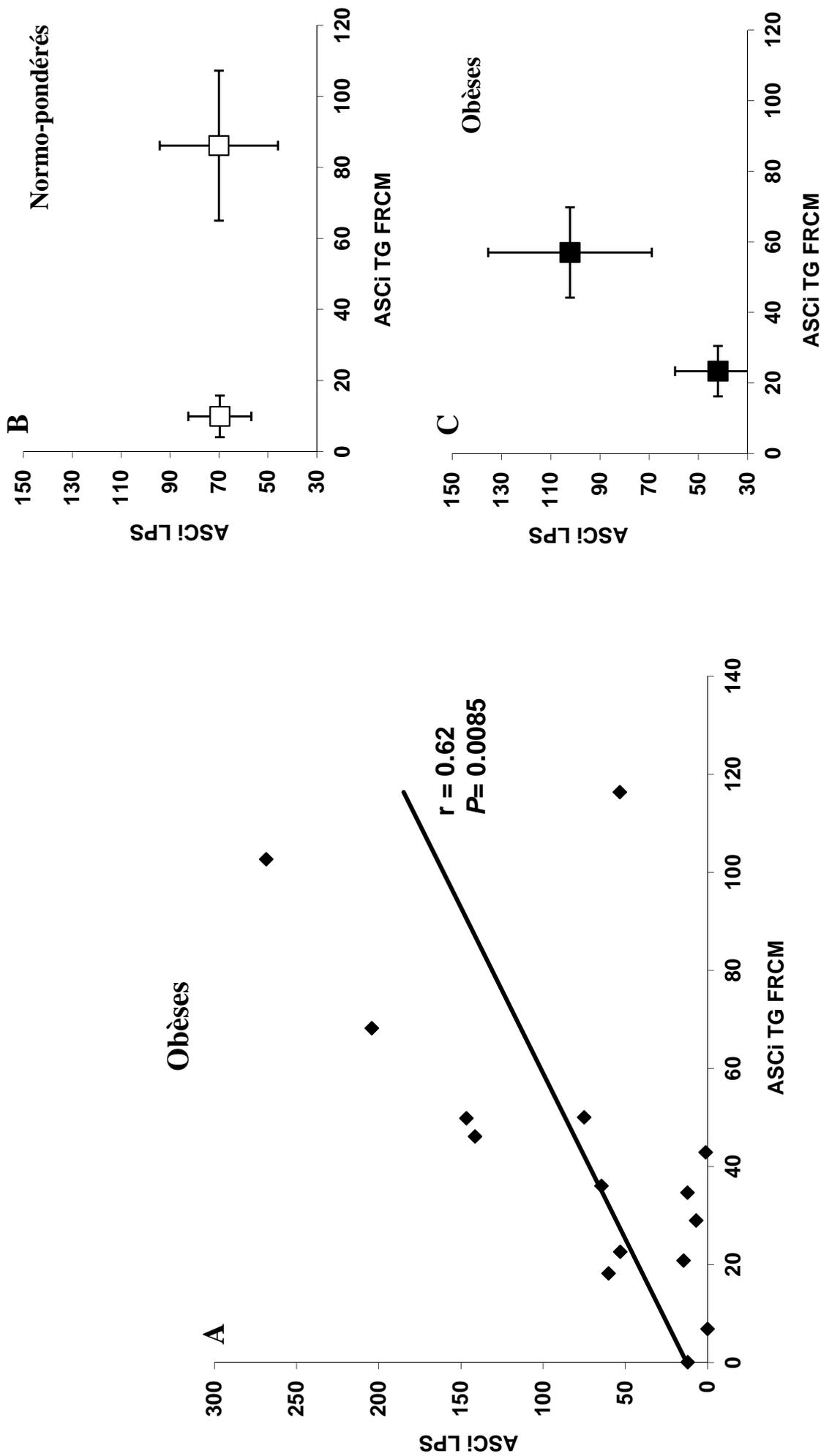


Figure 28. Corrélations entre LPS plasmatiques et TG de la fraction riche en chylomicrons (FRCM), après consommation de 10 g tartine et 40 g tartine confondus (A) ou séparés (C), chez les sujets obèses (A, C) et les sujets normo-pondérés (B), sur la période postprandiale 0-300 min. Les données présentées sont des ASCi individuelles (A) ou moyennées \pm ESM (B, C), $n=8$ par groupe. (A) Test Z de corrélation.

Corrélation entre endotoxémie et triglycéridémie

A partir des données de LPS plasmatiques suite aux tests à 10 g vs 40 g de matière grasse tartinée (n=8 sujets par groupe), nous avons cherché si une corrélation existait avec les concentrations correspondantes en TG de la FRCM (**figure 28**). D'après les résultats précédents, il se dégage chez les sujets obèses un effet de la quantité de matière grasse ingérée sur l'endotoxémie. Une corrélation entre ASCi des LPS plasmatiques et ASCi des TG de la FRCM est en effet observée, pour les sujets obèses, avec les repas 10 g et 40 g tartinés ($r= 0.62$ et $P= 0.0085$; A). En cumulé sur la journée, la présence d'une plus grande quantité de matière grasse tartinée ingérée est associée à une plus forte exposition aux endotoxines chez les obèses (D). Ceci confirme, à structure d'apport identique, un « effet quantité » de la MG sur l'endotoxémie ; ce phénomène n'est pas retrouvé chez les sujets normo-pondérés (C).

2.1.3. Discussion

A l'heure actuelle, plusieurs études ont démontré que l'absorption de matière grasse s'accompagne d'une absorption de LPS, provoquant une endotoxémie dite métabolique (cf. Chap.1, § 5.2.3). Ce phénomène d'endotoxémie apparaît alors en période postprandiale, et ce à la fois chez des sujets sains et chez des personnes souffrant de maladies métaboliques (cf. Chap.1, § 5.2.2). Cependant, la modulation de cette endotoxémie postprandiale par la quantité ou la structure de la matière grasse ingérée n'a encore jamais été étudiée chez l'Homme, à notre connaissance. De plus, les cinétiques d'endotoxémie relatées dans la littérature sont basées sur quelques points seulement (souvent 1-3 ou 2-4 heures) et ne sont donc pas caractérisées de manière exhaustive. Après avoir démontré, chez des sujets normo-pondérés et obèses, l'impact de la quantité et de la structure de la matière grasse ingérée sur le métabolisme lipidique, nous avons donc cherché à évaluer ces effets sur l'endotoxémie métabolique associée.

Dans notre étude, suite à la consommation de matière grasse (tous petits-déjeuners confondus), une endotoxémie plasmatique transitoire est observée pour l'ensemble des sujets ($C_{\max} > C_{\text{basale}}$, $P < 0,05$), comme décrit précédemment dans d'autres études (Erridge *et al.* 2007; Laugerette *et al.* 2011; Ghanim *et al.* 2009). La digestion de matière grasse consommée au petit-déjeuner entraîne ainsi un taux de LPS circulants supérieur à celui observé à jeun. Nous avons également relevé un temps d'apparition de la concentration maximale en LPS (T_{\max}) plus tardif suite aux 40 g de MG tartinée par rapport notamment aux 40 g de MG émulsionnée, ce qui est cohérent avec les résultats de lipémie postprandiale, dont

l'augmentation était plus précoce et plus rapide suite à la consommation de l'émulsion (cf. Chap.4, § 1.2). Concernant les cinétiques d'endotoxémie, leur profil ne semble pas être modifié par la quantité ni la structure de la MG ingérée chez les normo-pondérés. Cependant, chez les obèses, un pic d'endotoxémie tend à apparaître au bout de 180 minutes suite à la tartine de 40 g de matière grasse. On comprend alors qu'avec des mesures d'endotoxémie toutes les heures, voire toutes les demi-heures, sur une journée de 8 heures, il est plus difficile de faire ressortir des évènements distincts ou des variations marquées, d'autant que le phénomène d'endotoxémie postprandiale s'avère transitoire et assez individu-dépendant. En revanche, cumulé sur la journée (0-480 min), l'absorption de LPS (ASCi) s'avère augmentée après la consommation d'une quantité plus importante de lipides (40 g vs 10 g tartinés), ce qui est cohérent avec l'absorption lipidique observée (cf. Chap.4, § 1.1.3). Une corrélation significative positive est ainsi retrouvée entre les LPS plasmatiques et la teneur en TG de la fraction riche en chylomicrons suite à la consommation de quantités croissantes de matière grasse tartinée, chez l'obèse, sur la période 0-300 min. Clemente-Postigo et ses collaborateurs ont récemment décrit l'endotoxémie postprandiale observée au bout de 3 heures de digestion d'un repas contenant 50 g de lipides, chez des obèses morbides (Clemente-Postigo *et al.* 2012), et ont également mis en avant une corrélation entre triglycéridémie et endotoxémie postprandiales. Il faut noter que nous obtenons des valeurs d'endotoxémies (dans le plasma et les chylomicrons) du même ordre de grandeur que celles observées chez leurs patients obèses (de 0 à 2 UE/mL). Nous souhaitons souligner ici qu'une endotoxémie supérieure peut également être due à une qualité de LPS différente (LPS plus actifs, cf. Chap.1, § 3.3.3) ; la caractérisation du microbiote des sujets étudiés serait ainsi un bon complément des mesures d'endotoxémie dans les études à venir.

Par ailleurs, nous avons montré que les particules de la FRCM présentent des teneurs variées en LPS au cours du temps, selon la quantité et la structure de la MG ingérée. De manière intéressante, un pic précoce d'endotoxines est observé dans la FRCM au bout de 60 minutes suite à la consommation de l'émulsion, ce qui peut alors s'expliquer par une apparition précoce de la lipémie *via* le déstockage entérocytaire (cf. Chap.1, § 3.2.3) et qui se combine avec l'absorption rapide de TG induite par la digestion efficace de l'émulsion. Un pic d'endotoxines aussi distinct et précoce n'est pas observé avec 40 g de MG tartinée mais une endotoxémie plasmatique de plus faible amplitude apparaît tout de même dès la première heure ; nous supposons qu'un relargage éventuel de TG entérocytaires déclenché en début de

digestion pourrait être à l'origine de cette endotoxémie, qui reste alors globalement faible, certainement en raison du retard à la digestion de la tartine.

Il est important de noter que les présents résultats sont cohérents avec ceux publiés préalablement par notre équipe, où il a été mis en évidence une augmentation transitoire de l'endotoxémie postprandiale chez des jeunes hommes sains, suite à la consommation d'un repas à base de 33 g de lipides principalement sous forme d'une émulsion entérale (Laugerette *et al.* 2011). Un pic d'endotoxémie plasmatique était en effet observé au bout de 60 min de digestion en moyenne, et la fraction des chylomicrons correspondante était enrichie en LPS, tout comme ici avec l'émulsion à 40 g de MG. La forme émulsionnée induit toutefois chez l'obèse une diminution légère mais significative de l'absorption de LPS sur la journée, par comparaison à la tartine à base de 40 g de MG. Ce résultat soulève alors la question de l'importance métabolique ou non d'une telle différence.

Ainsi, au vu de ces résultats, nous montrons que la quantité et la structure de la MG ingérée sont de nature à moduler l'endotoxémie postprandiale, par l'intermédiaire des chylomicrons, et ce chez l'obèse, et non chez les normo-pondérés. Jusqu'à présent, Amar et ses collaborateurs avait mis en avant un lien entre la quantité de lipides ingérés et l'endotoxémie métabolique (Amar *et al.* 2008). Clemente-Postigo et ses collaborateurs avaient, quant à eux, montré que l'endotoxémie postprandiale était corrélée aux taux de TG circulants à jeun et en postprandial, chez l'obèse morbide (Clemente-Postigo *et al.* 2012). Dans ce contexte, nous montrons pour la première fois, chez l'obèse modéré en situation postprandiale réaliste, une augmentation de l'exposition aux endotoxines proportionnelle à la quantité de MG ingérée, augmentation qui pourrait être diminuée lorsque les lipides sont émulsionnés.

2.2. Effet d'une diminution de l'absorption intestinale via un by-pass gastrique (étude Bibop)

2.2.1. Introduction

Chez les patients présentant une obésité morbide, la chirurgie bariatrique, avec notamment le by-pass gastrique (BPG), est proposée en raison des effets reconnus sur la perte de poids, l'amélioration des co-morbidités (diabète, hypertension artérielle, paramètres respiratoires) et la réduction de mortalité (cf. Chap.1, § 1.3). La perte de poids est associée à une amélioration des anomalies métaboliques (insulino-résistance, dyslipidémie) et de

l'inflammation chronique de bas grade, caractérisant l'obésité évoluée. L'amélioration rapide de l'insulino-résistance constatée après by-pass gastrique n'est pas observée avec les autres techniques purement restrictives (gastroplastie par anneau modulable, *sleeve* gastrectomy), suggérant que cette amélioration ne serait pas uniquement liée à la perte pondérale. Plusieurs hypothèses dans la littérature sont évoquées. Des données récentes montrent que les changements des sécrétions intestinales pourraient expliquer en partie ces effets (Troy *et al.* 2008). Cependant, il a été montré que le taux de ghréline n'était pas affecté par le by-pass gastrique chez des patients obèses et n'était pas corrélé à la prise calorique journalière après chirurgie (Korner *et al.* 2005). Le rôle de la néoglucogénèse intestinale, activée par le court-circuit gastro-intestinal, a aussi été récemment mis en avant, chez la souris, comme l'un des mécanismes expliquant une sensibilité améliorée à l'insuline (Troy *et al.* 2008). Une autre hypothèse implique les LPS bactériens car, compte tenu du court-circuit intestinal spécifique à la technique du by-pass, l'endotoxémie plasmatique pourrait être diminuée et, par conséquent, l'inflammation à bas bruit à l'origine de l'insulino-résistance le serait également. Des changements importants de l'écologie microbienne ont également été observés chez ces patients obèses suite à leur chirurgie (Frige *et al.* 2009; Furet *et al.* 2010; Woelnerhanssen *et al.* 2011), indiquant un rôle potentiel du microbiote intestinal dans l'amélioration métabolique observée. Par ailleurs, de nombreuses études ont porté sur l'analyse des divers changements métaboliques suite à l'opération mais il est important de noter que beaucoup d'entre elles reposent sur la comparaison de paramètres métaboliques à jeun, avant et après chirurgie. Concernant le métabolisme lipidique, il a ainsi été décrit une diminution significative des paramètres lipidiques sanguins (TG, cholestérols ...) à jeun post-opération (Furet *et al.* 2010). Au sujet des endotoxines, une seule étude à ce jour a décrit l'endotoxémie chez des patients obèses post-by-pass et a démontré une diminution du taux plasmatique de LPS à jeun, suite à la chirurgie, très faible cependant : 0,5 vs 0,4 EU/mL (Monte *et al.* 2012). A notre connaissance, aucune étude ne s'est encore vraiment intéressée à caractériser en détail la période postprandiale chez ces sujets, après chirurgie. C'est pourquoi nous avons souhaité explorer de manière plus approfondie si une diminution importante d'absorption lipidique par la chirurgie de by-pass modifiait l'absorption de LPS au cours de la digestion de matière grasse émulsionnée. Le repas test à base de 40 g de MG émulsionnée a été choisi suite aux observations faites dans le protocole Lipinflox chez les obèses, qui ont démontré de meilleures capacités à absorber et à beta-oxyder des lipides sous forme émulsionnée. De plus, compte tenu du protocole basé sur des tests de digestion avant mais aussi après by-pass, les

Tableau 13. Paramètres anthropométriques et métaboliques à jeun avant et après by-pass (BP) gastrique

	Avant BP (n=5)	Après BP (n=5)	P
Paramètres anthropométriques			
Age (années)	38 ± 5	38 ± 5	<i>ns</i>
Poids corporel (kg)	120,6 ± 5,2	102,0 ± 4,7	0,001
Masse grasse (kg)	54,6 ± 5,4	37,4 ± 5,0	0,0003
Masse maigre (kg)	64,7 ± 4,7	63,7 ± 3,9	<i>ns</i>
IMC (kg/m ²)	43,9 ± 1,3	37,1 ± 1,3	0,001
Tour de taille (cm)	124,4 ± 5,9	108,0 ± 5,5	0,022
Paramètres métaboliques à jeun			
Glucose (mM)	5,92 ± 0,74	4,66 ± 0,28	0,145
Insuline (mUI/L)	8,30 ± 0,96	4,05 ± 0,35	0,009
HOMA	2,20 ± 0,31	0,88 ± 0,07	0,029
Cholestérol total (mM)	5,30 ± 0,76	4,25 ± 0,36	0,065
Cholestérol HDL (mM)	1,14 ± 0,09	1,07 ± 0,07	<i>ns</i>
Cholestérol LDL (mM)	3,60 ± 0,70	2,72 ± 0,35	0,065
Triglycérides (mM)	1,16 ± 0,11	0,86 ± 0,08	0,021

IMC : indice de masse corporelle ; HDL : high density lipoproteins ; HOMA : homeostasis model assessment ;
ns : non significatif ; VLDL : very low density lipoproteins

Les données présentées sont des moyennes ± SEM.

Valeurs de *P* obtenues par tests t de Student appariés.

repas tests se devaient d'être facilement consommables par les sujets obèses 3 mois après leur opération, où les aliments liquides ou semi-solides sont recommandés. Ainsi, au cours de deux journées d'exploration métabolique (l'une avant et l'autre 3 mois après l'opération), nous avons suivi pendant 5 heures l'évolution de la triglycéridémie et de l'endotoxémie postprandiales, des concentrations plasmatiques des transporteurs des endotoxines et de la cytokine inflammatoire IL-6, suite à la consommation de 40 g de matière grasse émulsionnée.

2.2.2. Résultats

Dans cette partie sur les résultats cliniques, nous parlerons des périodes « avant opération » et « après opération », correspondant chacune à une journée test ayant eu lieu 3 semaines précédant l'opération chirurgicale et une autre journée test 3 mois suivant l'opération (**figure 16**, partie inférieure). La composition macro-nutritionnelle du petit déjeuner test (émulsion similaire à celle du protocole Lipinflox + biscottes) est décrite dans le **tableau 8**. L'étude Bibop est actuellement toujours en cours ; seuls les résultats des 5 premiers sujets seront présentés dans ce manuscrit. Les résultats des mesures de calorimétrie indirecte ne seront pas traités dans ce manuscrit. Par ailleurs, les patients ont présenté quelques difficultés à consommer la globalité du second repas ; nous n'avons donc pas pris en compte la seconde période postprandiale (300-480 min) dans les résultats présentés ci-dessous, pour nous concentrer sur la phase de digestion du petit-déjeuner test (0-300 min).

Modifications anthropométriques après by-pass gastrique

Les caractéristiques anthropométriques des sujets obèses, étudiés dans le protocole Bibop, avant et après chirurgie de by-pass gastrique, sont résumées dans le **tableau 13**. L'ensemble des sujets étudiés ($n=5$, dont 3 femmes et 2 hommes) présentaient une moyenne d'âge de 38 ans (± 5 ans). Avant opération, les sujets avaient un IMC supérieur à 40 kg/m^2 ($43,9 \pm 1,3 \text{ kg/m}^2$) ainsi qu'un tour de taille de $124,4 \pm 5,9 \text{ cm}$. Trois mois après by-pass gastrique, la perte de poids moyenne a été de $18,5 \pm 1,9 \text{ kg}$ ($P= 0,001$) et l'IMC des sujets a chuté en moyenne de 6,7 points ($\pm 0,7 \text{ kg/m}^2$; $P= 0,001$). Une diminution importante de la masse grasse a également été observée après opération : elle est passée de $54,6 \pm 5,4 \text{ kg}$ à $37,4 \pm 5,0 \text{ kg}$ ($P= 0,0003$). La masse maigre n'a, quant à elle, pas évolué.

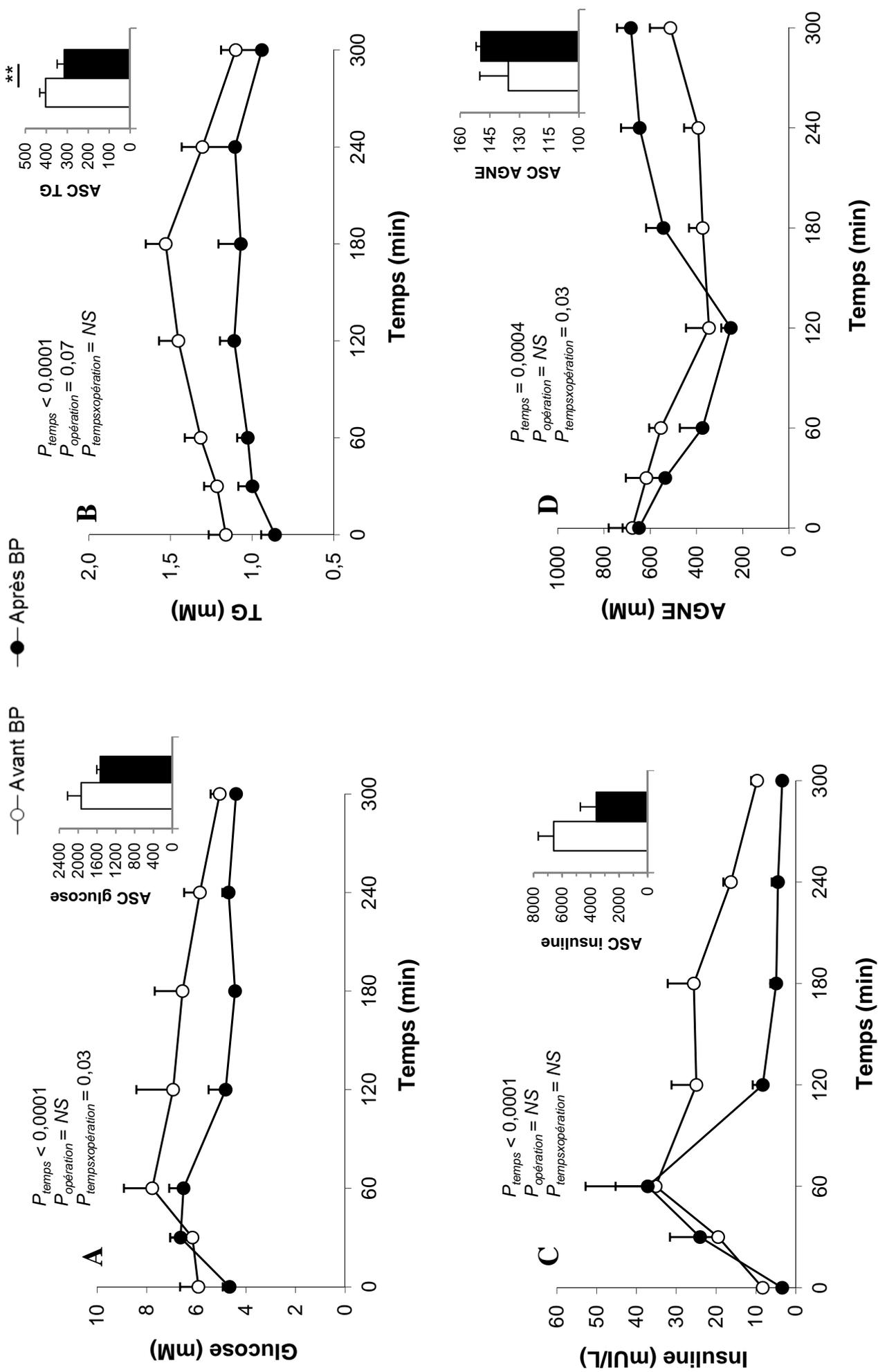


Figure 29. Cinétiques postprandiales de glycémie (A), triglycéridémie (B), insuliniémie (C), AGNE (D), et ASC correspondantes en insert, après consommation d'une émulsion à 40 g de matière grasse, avant (ronds blancs) et après (ronds noirs) by-pass (BP) gastrique. Les données présentées sont des moyennes ± ESM, n=5 par groupe. (A-B-C-D) P_{temps} , $P_{opération}$ et $P_{temps \times opération}$ pour la période postprandiale de 0 à 300 min (ANOVA mesures répétées suivies d'un test post-hoc PLSD de Fisher) ; (B) ** $P < 0,01$ pour ASC (test de Wilcoxon).

Modifications métaboliques à jeun et en postprandial, après by-pass gastrique

Les paramètres métaboliques à jeun des sujets, avant et après chirurgie de by-pass gastrique, sont également présentés dans le **tableau 13**. Après chirurgie, une amélioration de tous les paramètres du syndrome métabolique a été observée, le syndrome métabolique étant défini selon les critères du National Cholesterol Education Program (JAMA 2001) par la présence d'au moins 3 critères parmi lesquels : tour de taille > 102 cm (homme) ou > 88 cm (femme), TG > 1,69 mM, HDL < 1,04 mM (homme) ou < 1,30 mM (femme), tension artérielle > 130/80 mmHg, glycémie à jeun > 6,1 mM. En effet, on constate notamment une chute très significative de l'insulinémie à jeun ($8,30 \pm 0,96$ mUI/L vs $4,05 \pm 0,35$ mUI/L). Les paramètres lipidiques circulants (TG et cholestérols) ont aussi été sensiblement diminués, notamment la triglycéridémie à jeun ($1,16 \pm 0,11$ vs $0,86 \pm 0,08$; $P= 0,021$). De la même manière, certains marqueurs de la sensibilité à l'insuline (glycémie, insulinémie, HOMA) ont été améliorés suite à l'opération.

En postprandial, suite à la digestion de 40 g de matière grasse émulsionnée, les cinétiques de glycémie, triglycéridémie, insulinémie et celles des AGNE sont présentées en **figure 29**. L'opération de by-pass gastrique engendre au cours du temps une moindre glycémie et des AGNE circulants moins élevés ($P_{\text{tempsxopération}}= 0,03$, A-D). Le by-pass tend également à avoir un effet sur la cinétique de triglycéridémie postprandiale ($P_{\text{opération}}= 0,07$), en la diminuant tout au long des 5 premières heures de digestion (B). Nous devons noter que l'ASC des TG suite au by-pass est tout de même significativement diminuée ($P < 0,01$; insert B).

Modifications à jeun et en postprandial de l'endotoxémie après by-pass gastrique

Avant by-pass, les endotoxémies basale et maximale en postprandial ne sont pas significativement différentes (**figure 30** A). Ceci est dû à une grande variabilité de l'endotoxémie à jeun parmi ces sujets à l'état métabolique particulièrement altéré ; en particulier, un sujet présentait une endotoxémie à jeun très supérieure aux autres ($1,35$ EU/mL vs $0,2 \pm 0,07$ EU/mL chez les quatre autres), sans augmentation postprandiale, et avec une masse grasse plus élevée que les autres ($73,6$ kg chez ce sujet vs 50 ± 3 kg chez les quatre autres). Suite au by-pass, le faible nombre de sujets étudiés ne permet pas d'atteindre une significativité concernant une diminution de l'endotoxémie à jeun. Nous devons cependant noter que chez le sujet présenté ci-dessus, le by-pass a eu pour effet de diminuer l'endotoxémie à jeun de $1,35$ EU/mL à $0,24$ EU/mL, réduisant ainsi la variabilité au sein de la cohorte suite à l'opération. Après by-pass, l'endotoxémie maximale postprandiale devient

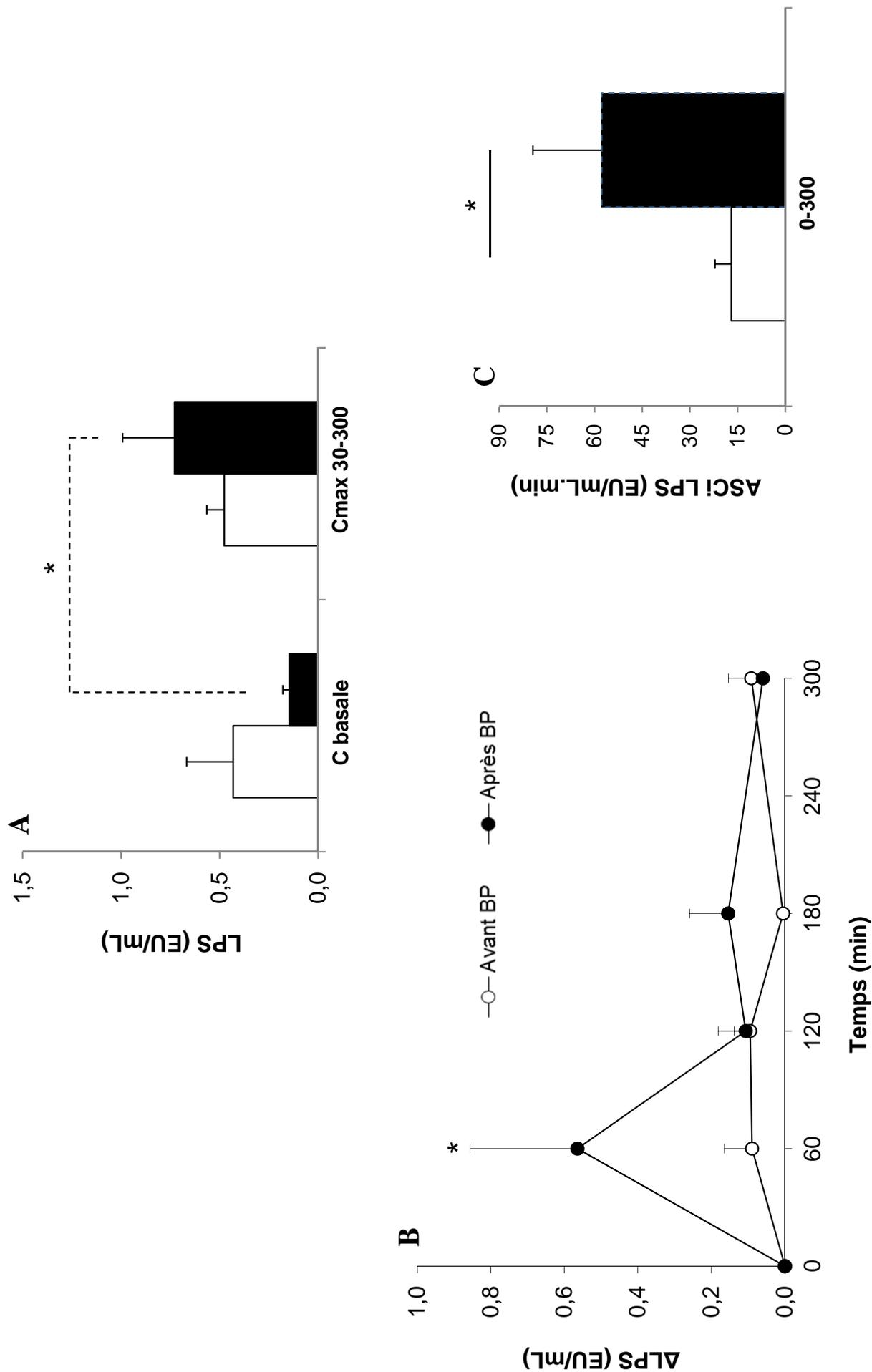


Figure 30. Concentrations en LPS à jeun et maximale sur la période 30-300 min (A), cinétiques postprandiales d'augmentation de LPS au cours des 5 premières heures (B) et ASCi de LPS correspondantes (C), après consommation d'une émulsion à 40 g de matière grasse, avant (ronds et barres blancs) et après (ronds et barres noirs) by-pass gastrique (BP). Les données présentées sont des moyennes \pm ESM, $n=5$ par groupe. (A) * $P < 0,05$ C_{\max} vs C_{basale} après BP (test de Wilcoxon), (B) * $P < 0,05$ 60 min vs 0 min après BP (test de Wilcoxon), (C) * $P < 0,05$ (test de Wilcoxon).

significativement plus élevée que la valeur à jeun ($P < 0,05$). La cinétique d'augmentation de l'endotoxémie postprandiale par rapport au basal (Δ LPS), suite à la consommation d'un petit-déjeuner à base de 40 g de matière grasse émulsionnée, est représentée en **figure 30 B**. Suite à l'opération, les patients sont davantage exposés aux LPS dans la matinée, après la prise du petit-déjeuner, avec un pic marqué à 60 min. Ceci a pour conséquence une augmentation de l'exposition postprandiale aux LPS après by-pass (cf. ASCi, **figure 30 C**).

2.2.3. Discussion

La chirurgie du by-pass gastrique induit de nombreux changements métaboliques compte tenu de la résection de la poche gastrique associée à un court-circuit intestinal. Comme attendu, une amélioration des paramètres lipidiques, hormonaux et de la sensibilité à l'insuline a été observée au bout de 3 mois post-opération. D'autres études ont mis également en évidence des diminutions similaires, à jeun, des taux de TG, cholestérol, glucose, insuline et HOMA après chirurgie du by-pass gastrique (Frige *et al.* 2009; Murri *et al.* 2010; Kullberg *et al.* 2011; Woelnerhanssen *et al.* 2011). En plus de l'observation de paramètres métaboliques à jeun, nous avons également suivi l'évolution de certains d'entre eux en postprandial, suite à la consommation d'un petit-déjeuner à base de 40 g de matière grasse émulsionnée, et ce, avant et après opération. Aucune étude à ce jour n'avait encore exploré la réponse postprandiale à un test complet de digestion, avant et après chirurgie. Suite au by-pass, les niveaux de glycémie, d'insulinémie et des concentrations en AGNE tout au long des 5 heures de digestion sont diminués par rapport à ceux relevés avant opération, même si les différences ne sont pas significatives pour le moment, très certainement en raison du faible effectif de sujets ($n=5$). En revanche, concernant les triglycérides, des différences entre cinétiques avant et après opération apparaissent déjà ($P_{\text{opération}} < 0,05$) et, cumulée sur 5 heures de digestion, l'absorption des TG (ASC) est retrouvée diminuée suite à l'opération. Un des intérêts principaux du by-pass gastrique est, en effet, la diminution de l'absorption lipidique, d'où la diminution du taux de TG circulants à jeun et de la lipémie postprandiale. D'après certains auteurs, une baisse de la lipémie postprandiale diminuerait le flux portal d'AG libres et donc le dépôt d'AGL dans les tissus périphériques (muscle strié, foie et pancréas), contribuant ainsi à l'amélioration de l'insulino-résistance (Raz *et al.* 2005).

En parallèle, nous avons évalué l'endotoxémie plasmatique à jeun ainsi qu'en période postprandiale, associée à la digestion de matière grasse, avant et après la chirurgie de by-pass. En diminuant de manière importante l'absorption lipidique globale via un by-pass gastrique,

nous avons émis l'hypothèse que l'absorption conjointe de LPS serait également diminuée, induisant une baisse de l'endotoxémie plasmatique. Compte tenu du faible nombre de sujets étudiés et de la variabilité des résultats d'endotoxémie entre individus, nous n'avons pas pu mettre en évidence à ce jour une diminution significative des LPS plasmatiques à jeun après by-pass gastrique bien qu'une tendance semble apparaître. Il est d'ailleurs important de noter que l'un de nos patients présentant une endotoxémie très élevée à jeun était celui qui avait une quantité de masse grasse la plus importante avant opération et pour qui nous avons observé une chute drastique de l'endotoxémie à jeun après by-pass ; ces données préliminaires peuvent suggérer qu'une diminution de l'endotoxémie à jeun après by-pass ne serait observée que chez les sujets les plus sévèrement obèses. Si l'on s'intéresse aux travaux de la littérature, une seule étude à l'heure actuelle a caractérisé l'endotoxémie à jeun de patients obèses, avant et après leur opération (Monte *et al.* 2012). Il est alors important de noter que les auteurs décrivent une baisse des LPS plasmatiques d'environ 0,5 à 0,4 EU/mL, statistiquement significative mais faible, suite à la chirurgie. Dans notre étude, l'endotoxémie moyenne diminue de 0,4 à 0,1 EU/mL après l'opération, mais cette différence n'est pas significative étant donné le faible nombre de sujets et la variabilité interindividuelle.

Par ailleurs, malgré une diminution de l'absorption des nutriments, l'endotoxémie postprandiale est quant à elle augmentée transitoirement (pic à 60 min) après by-pass, suite à un repas avec 40 g de matière grasse émulsionnée. Compte tenu de la stimulation de l'absorption lipidique par la forme émulsionnée (cf. Chap.4, § 1.2), nous ne pouvons pas exclure que cela ait pu participer à exacerber le phénomène d'endotoxémie précoce observé dans les chylomicrons. Nous avons d'ailleurs observé que le pourcentage d'augmentation des TG plasmatiques durant les trente premières minutes de digestion était plus élevé après l'opération (14 vs 5% avant by-pass), pouvant potentiellement entraîner l'absorption de plus d'endotoxines. De plus, l'hypothèse d'une altération de la qualité de la muqueuse intestinale suite à l'opération n'est certainement pas à exclure, notamment *via* (i) une possible augmentation locale de la perméabilité paracellulaire intestinale (Frazier *et al.* 2011) et/ou (ii) une pullulation bactérienne à certains niveaux de l'intestin résiduel tels que l'anse borgne (Leung Ki *et al.* 2010), pouvant ainsi former un réservoir d'endotoxines. De plus, des modifications du microbiote intestinal après chirurgie bariatrique peuvent contribuer à générer des LPS plus actifs, pouvant se traduire par des pics d'endotoxémie plus élevée, comme observé dans notre étude. L'équipe de J.P. Furet a d'ailleurs mis en évidence une

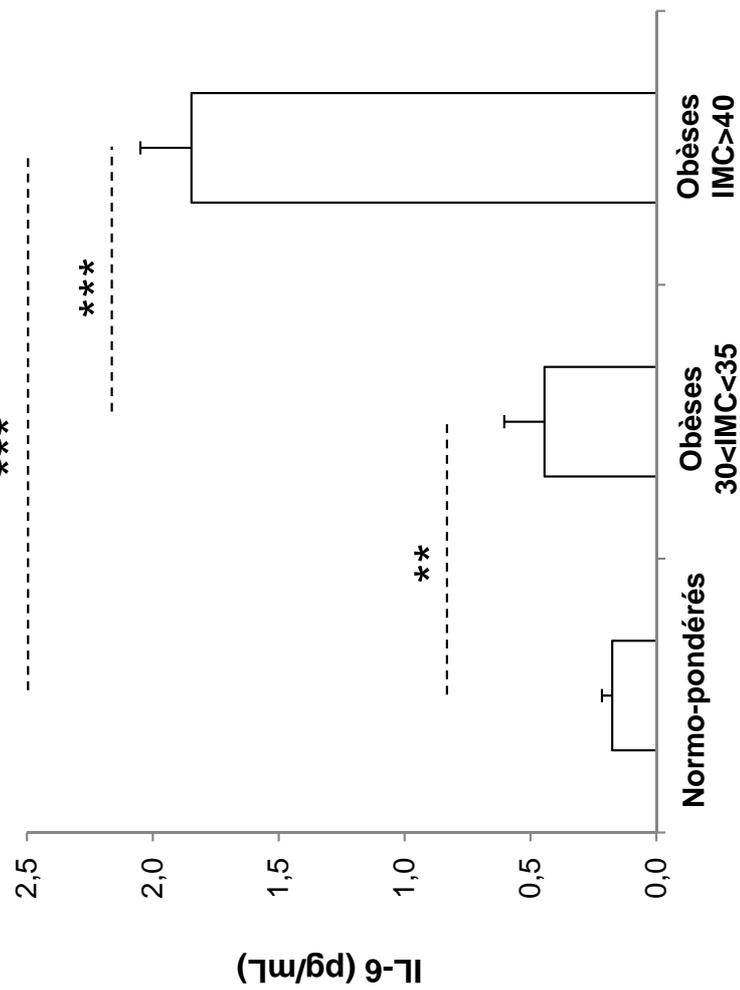


Figure 31. Concentrations à jeun en IL-6 chez les sujets normo-pondérés, obèses modérés et obèses morbides. Les données présentées sont moyennes \pm SEM, n=8 par groupe sauf obèses morbides où n=5. ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$ (tests t de Student non appariés).

augmentation des espèces *Escherichia coli* (bactéries Gram négatif) 3 mois après un by-pass gastrique (Furet *et al.* 2010).

Ainsi, compte tenu de nos travaux et résultats précédents (cf. Chap.4, § 1), il serait important d'optimiser, pour des sujets ayant subi un by-pass gastrique, la structure d'apport lipidique permettant de délivrer les acides gras essentiels de manière adéquate tout en limitant l'endotoxémie.

2.3. Perspectives sur l'impact métabolique de l'endotoxémie postprandiale : modifications des transporteurs de LPS en lien avec l'inflammation (études Lipinflox et Bibop)

2.3.1. Introduction

Au travers des précédents résultats des deux études cliniques, nous avons montré que (i) la quantité et la structure émulsionnée de la matière grasse ingérée modifient certains paramètres de cinétique d'absorption des LPS chez les obèses, (ii) les chylomicrons contribuent transitoirement à ce transport de LPS chez l'obèse, différenciellement selon la structure émulsionnée ou non de la matière grasse ingérée, et (iii) l'endotoxémie plasmatique transitoire en période postprandiale est augmentée suite à un by-pass gastrique chez l'obèse. Or, les propriétés pro-inflammatoires des LPS une fois dans le plasma peuvent être variables selon leur prise en charge par différents transporteurs plasmatiques tels que la LBP et le sCD14 (cf. Chap.1, § 5.2.2). Nous avons donc cherché à ouvrir des perspectives sur les relations possibles entre la quantité et la structure des lipides dans le repas et l'inflammation postprandiale *via* ces transporteurs d'endotoxines. Pour cela, nous avons mesuré les concentrations postprandiales d'IL-6, de LBP et de sCD14 en cinétique chez les sujets normo-pondérés et les sujets obèses du protocole Lipinflox (suite aux 3 repas différents : 10 g tartine, 40 g tartine et 40 g émulsion) ainsi que celles des sujets obèses morbides du protocole Bibop (suite au repas 40 g émulsion).

2.3.2. Résultats

D'après la **figure 31**, nous constatons que les obèses modérés ($30 \text{ kg/m}^2 < \text{IMC} < 35 \text{ kg/m}^2$) présentent davantage d'IL-6 pro-inflammatoire à jeun comparé aux sujets normo-pondérés (environ 2,5 fois plus, $P < 0,01$). Les obèses morbides ($\text{IMC} > 40 \text{ kg/m}^2$) ont quant à eux entre 4 et 10 fois plus d'IL-6 à jeun que les autres sujets ($P < 0,001$ vs normo-pondérés et

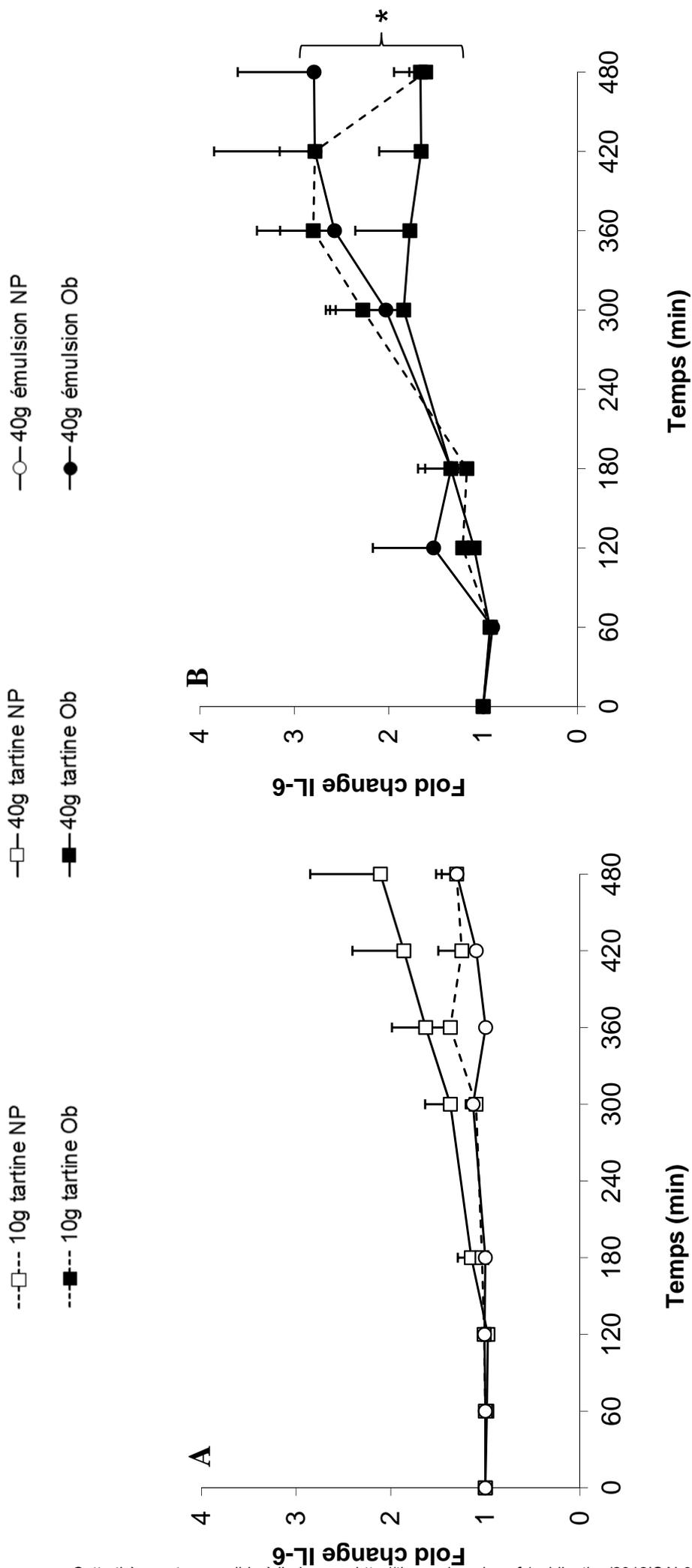


Figure 32. Cinétiques postprandiales de la cytokine IL-6, après consommation de 10 g tartine (carrés, lignes pointillées), 40 g tartine (carrés, lignes pointillées), 40 g tartine (carrés, lignes pleines) ou 40 g émulsion (ronds) chez les sujets normo-pondérés (A, C) et les sujets obèses (B, D). Les données présentées sont des fold change en moyennes \pm SEM, $n=8$ par groupe. (B) $P < 0,05$ à 480 min (tous repas) vs basal (tests t de Student appariés).

obèses modérés). En phase postprandiale (**figure 32**), suite aux différents petits-déjeuners tests, les normo-pondérés n'augmentent pas significativement l'IL-6 par rapport au basal (A), tandis que les obèses modérés présentent une augmentation d'IL-6 postprandiale continue (B). Les taux plasmatiques d'IL-6 atteints en fin de journée chez les obèses sont significativement supérieurs aux valeurs basales ($P < 0,05$). Cette inflammation postprandiale est similaire chez les obèses modérés, quelles que soient la quantité et la structure de la matière grasse ingérée. En parallèle, dans le cadre du protocole Lipinflox, au cours de la digestion des 3 repas tests (aux temps 0, 300 et 480 min), nous avons également mesuré l'expression des ARNm de certains marqueurs complémentaires (IL-1 β , TNF- α , IL-6, TLR4, CD14) à partir du sang total (cf. Chap.3, § 1.3.11) ; nous n'avons pas observé de modifications d'expression d'IL-1 β , de TLR4 et de CD14. Les expressions de TNF- α et IL-6 étaient, quant à elles, trop faibles pour être quantifiées, de même que la translocation de NF- κ B des globules blancs (cf. Chap.3, § 1.1.12), aux temps 0 et 300 minutes (données non montrées).

Du point de vue des transporteurs de LPS pouvant moduler cette inflammation, la concentration en LBP à jeun est supérieure chez les obèses modérés comparée à celle observée chez les normo-pondérés ($P < 0,01$) et d'autant plus élevée chez les obèses morbides ($P < 0,001$ vs normo-pondérés et obèses modérés, **figure 33 A**). En analysant les données de manière globale chez tous les sujets des protocoles Lipinflox et Bibop (avant et après by-pass), nous observons une corrélation entre la concentration plasmatique à jeun de LBP et celle d'IL-6 ($r=0,91$, $P < 0,0001$, **figure 33 C**). Par ailleurs, la concentration en sCD14 à jeun est significativement supérieure chez les obèses (modérés et morbides) comparée à celle observée chez les normo-pondérés ($P < 0,05$, **figure 33 B**). Nous n'observons pas de variation significative des transporteurs LBP et sCD14 en phase postprandiale au cours du temps, chez les minces et les obèses modérés, ni d'effet de la quantité ou de la structure de la matière grasse (données non montrées). En revanche, suite au by-pass gastrique, nous observons une diminution significative de la LBP à jeun ($P < 0,05$) et en phase postprandiale (ASC, $P < 0,05$) chez les obèses morbides après opération (**figure 34 A**), ainsi qu'une augmentation globale des concentrations plasmatiques en sCD14 en période postprandiale, suite à la chirurgie (ASC, $P < 0,05$; **figure 34 B**).

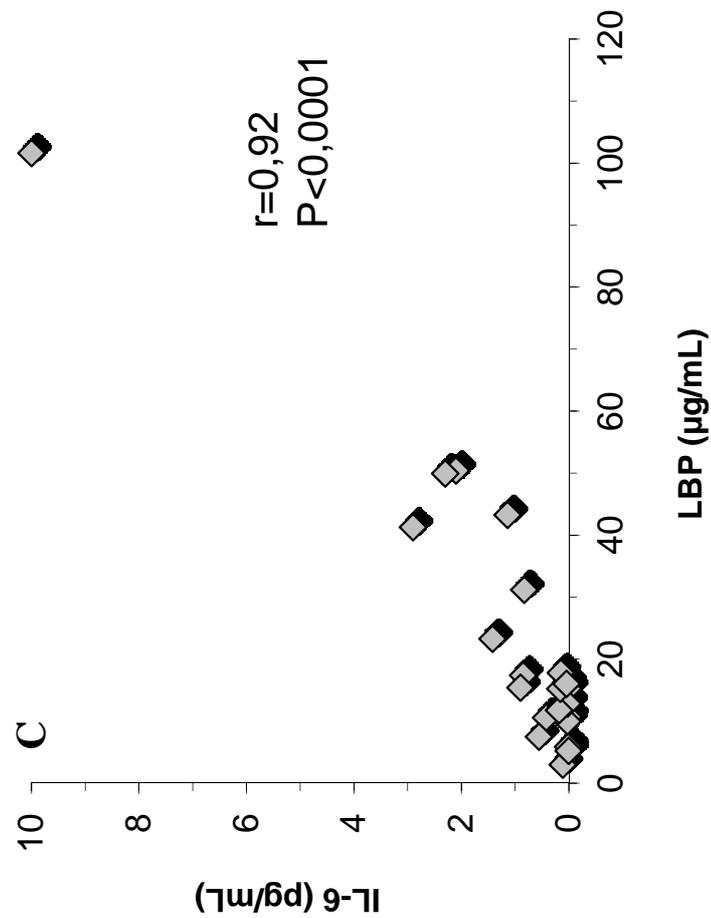
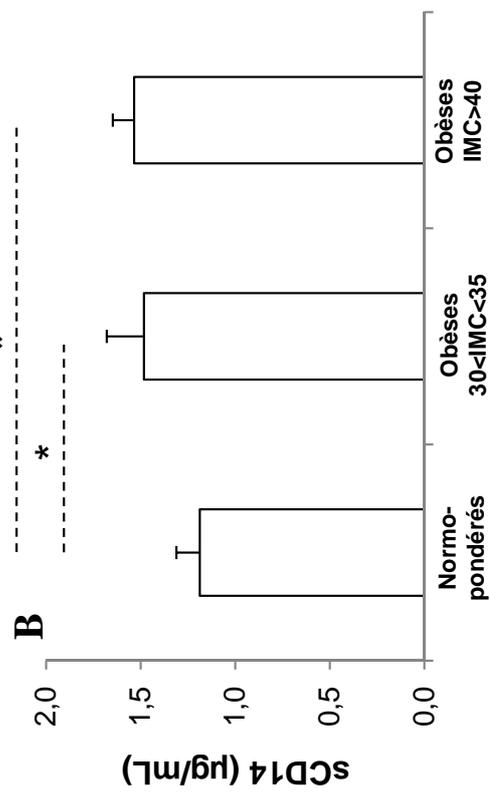
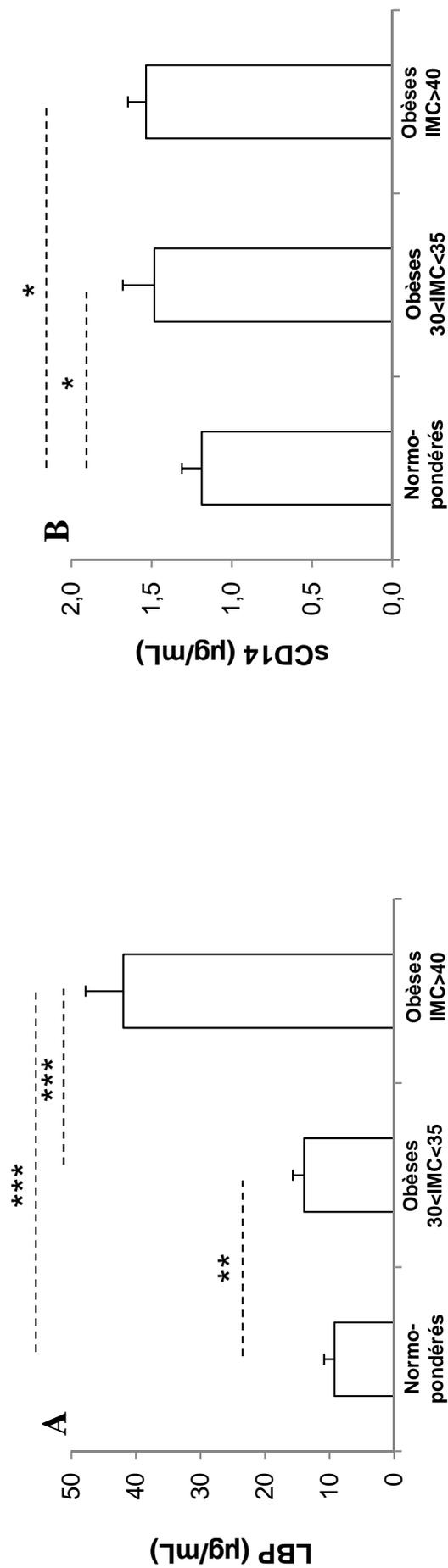


Figure 33. Concentrations à jeun en LBP (A) et sCD14 (B) chez les sujets normo-pondérés, obèses modérés et obèses morbides et corrélation entre concentrations à jeun en LBP et IL-6 plasmatiques (C), tous IMC confondus (normo-pondérés, obèses modérés et morbides). Les données présentées en A-B sont des moyennes \pm SEM, $n=8$ par groupe sauf obèses morbides (avant BP) où $n=5$. Les données présentées en C sont les moyennes des valeurs à jeun mesurées lors des 3 journées d'exploration Lipinflux et lors des la journée d'exploration Bibop avant BP. (A-B) * $P<0,05$, ** $P<0,01$ et *** $P<0,001$ (tests t de Student non appariés) ; (C) test Z de corrélation.

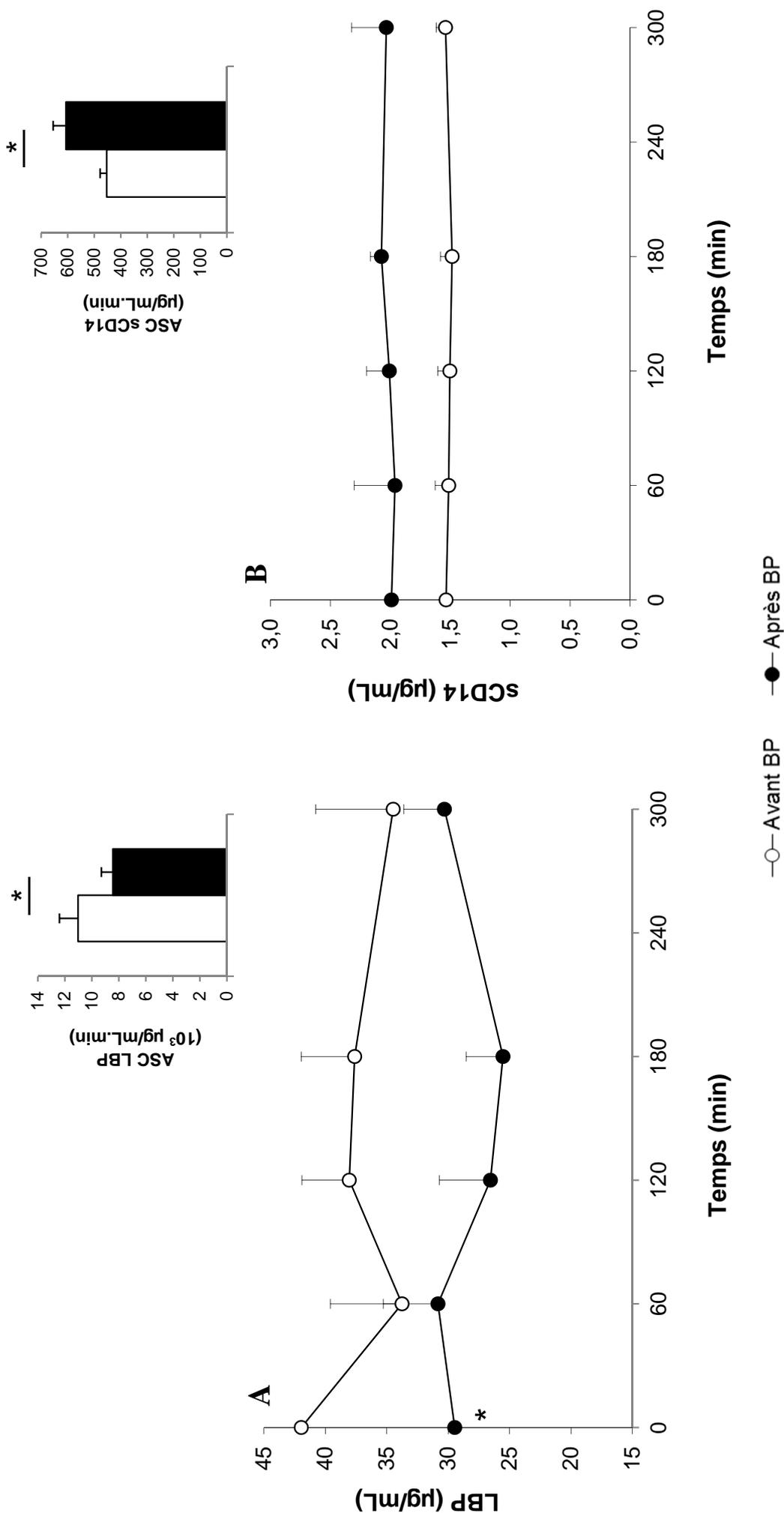


Figure 34. Cinétiques postprandiales des transporteurs LBP (A) et sCD14 (B), après consommation d'une émulsion à 40 g de matière grasse, chez les sujets obèses, avant (ronds blancs) et après (ronds noirs) by-pass gastrique (BP) ; ASC correspondantes en insert. Les données présentées sont des moyennes \pm SEM, n=5 par groupe. * $P < 0,05$ pour les ASC et LPB basale : avant vs après BP (tests *t* de Student appariés).

2.3.3. Discussion

Nous avons observé, à jeun, un état inflammatoire important, révélé par des taux plasmatiques d'IL-6 augmentés, et ce d'autant plus que l'IMC des sujets est élevé. Cette cytokine est connue pour être augmentée en situation d'obésité, en raison notamment de sa sécrétion par les cellules adipocytaires (cf. Chap.1, § 5.1.1). En période postprandiale, nous avons constaté une augmentation significative d'IL-6 circulante au cours du test de digestion chez les obèses modérés, ce qui n'est pas le cas pour les sujets normo-pondérés. D'après la littérature, une inflammation postprandiale peut être observée suite à des charges élevées en lipides (cf. Chap.1, § 5.1.2) et nous avons souligné que celle-ci s'avère également très influencée par le statut métabolique de la population étudiée. Nos résultats postprandiaux sont cohérents avec ces observations puisque 40 g de MG n'induit pas d'inflammation postprandiale, en aigu, chez des sujets sains normo-pondérés mais, chez des sujets au « tonus inflammatoire » plus élevé tels que les obèses modérés (Libby 2002), l'inflammation postprandiale s'avère augmentée en fin de journée test, suite à deux repas consécutifs. Une augmentation plasmatique d'IL-6, suite à la consommation de 71 g de lipides (apportée par de la crème lactière), a également été observée au bout de 4 à 6 heures de digestion chez des femmes obèses (Manning *et al.* 2008).

Ni la quantité, ni la structure de la MG ingérée par les obèses modérés ne semblent avoir eu d'impact sur l'inflammation postprandiale observée. Celle-ci ne serait donc pas liée, en aigu, à la quantité de chylomicrons ou de LPS absorbés. Cependant, la concentration plasmatique de LBP à jeun est augmentée chez ces sujets et d'autant plus chez les obèses morbides, suggérant que l'inflammation puisse être en lien avec la prise en charge des LPS *via* la LBP. En effet, nous avons observé une diminution à jeun et en phase postprandiale de la LBP suite au by-pass gastrique ; nous ne disposons malheureusement pas encore des résultats des dosages plasmatiques d'IL-6 après opération mais Monté et ses collaborateurs ont montré récemment qu'en plus d'une diminution des LPS plasmatiques après by-pass, les paramètres inflammatoires circulants CRP et MCP-1 étaient également diminués, ainsi que les expressions géniques de TLR4 et CD14 des monocytes circulants (Monté *et al.* 2012).

Par ailleurs, nous avons étudié l'ensemble de ces phénomènes en aigu mais l'effet chronique d'une absorption de LPS plus élevée ou différente en cinétique n'est pas à exclure, notamment chez des personnes au « tonus inflammatoire » plus élevé, comme les obèses. En effet, puisque la quantité et la structure des lipides sont de nature à moduler les caractéristiques de passage des LPS dans la circulation sanguine au cours d'un test de

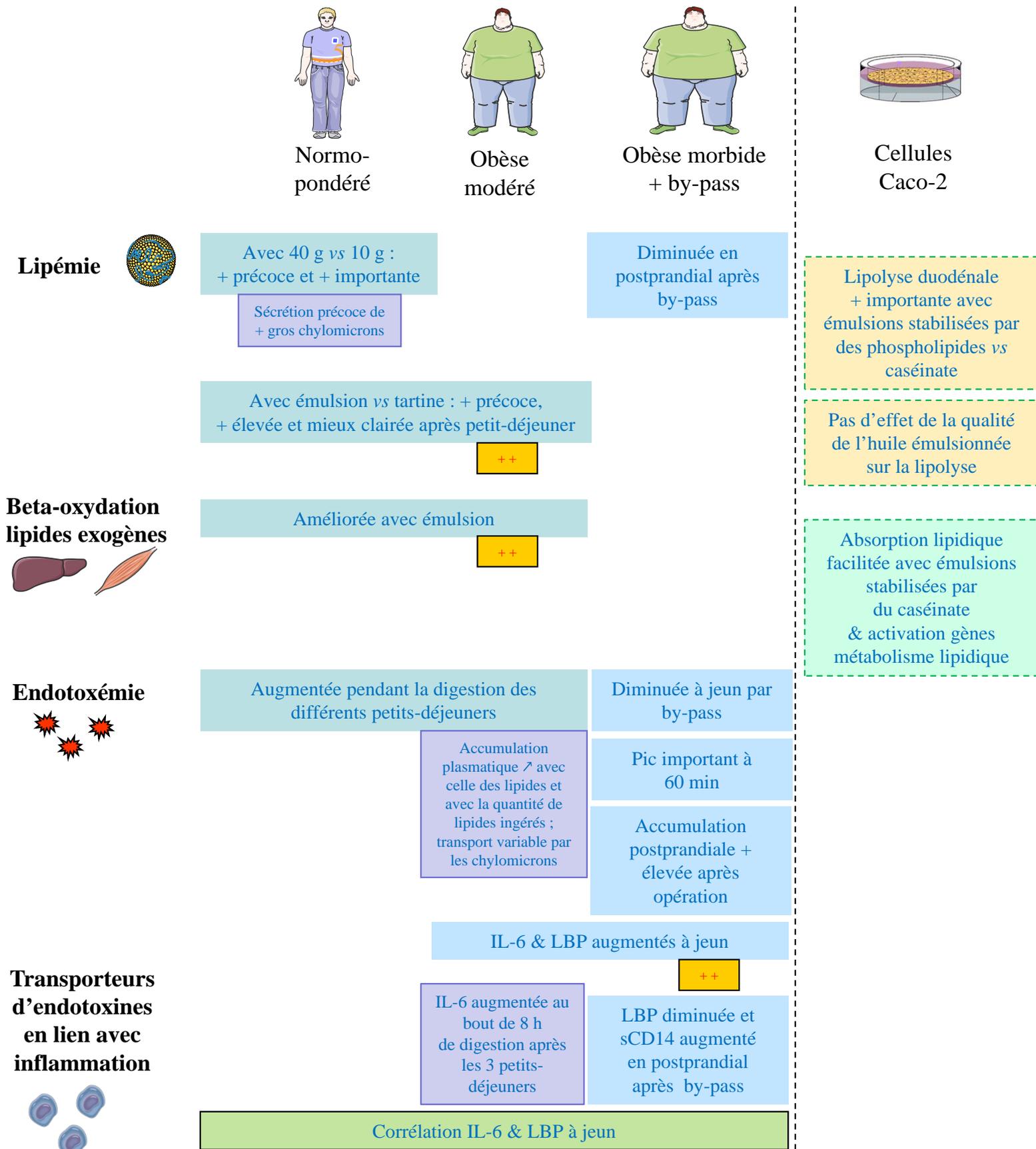


Figure 35. Résumé des principaux résultats de cette thèse - études cliniques et *in vitro*

digestion en aigu, il est envisageable qu'une consommation quotidienne de l'un ou l'autre des types de repas aboutisse, à terme, à une modification de la concentration plasmatique en transporteurs des LPS et notamment la LBP, dont nous montrons ici qu'elle est corrélée à l'IL-6 plasmatique. Dans notre équipe, des travaux sur modèles animaux ont déjà montré la possibilité d'une modulation nutritionnelle de LBP et de sCD14 par la composition en acides gras des huiles et leur relation avec le développement (plus de LBP) ou la prévention (plus de sCD14) de l'inflammation (Laugerette *et al.* 2012). Des études d'intervention chez l'homme basées sur une consommation quotidienne de différentes compositions et structures de lipides dans les repas devraient ainsi être menées afin de mieux comprendre les effets métaboliques à long terme, notamment sur les transporteurs d'endotoxines et l'inflammation associée.

La **figure 35** résume les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse.

CHAPITRE 5 - DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Métabolisme postprandial des lipides et structure de la matière grasse : aller au-delà de la quantité et de la qualité ingérées...

L'alimentation est un besoin avant tout, permettant d'apporter tous les nutriments essentiels au bon fonctionnement de l'organisme mais force est de constater que, dans nos sociétés occidentales actuelles, les mauvaises habitudes alimentaires ont pris le dessus et participent activement au développement de désordres métaboliques. Le transfert des apports énergétiques des repas formels vers d'autres prises alimentaires, plus ponctuelles et aux apports énergétiques souvent élevés, apparaît comme un phénomène non négligeable. La succession des repas associée au temps long de digestion et d'absorption des nutriments, durant des heures suite à la prise alimentaire, font que nous passons la majeure partie de notre temps en phase postprandiale. Les lipides qui constituent une large part de nos apports alimentaires sont montrés du doigt en raison de leur apport énergétique élevé et de la capacité quasi illimitée qu'a notre organisme à les stocker. L'étude du métabolisme postprandial des lipides chez l'Homme a ainsi mérité une attention toute particulière ces 30 dernières années. Si les lipoprotéines plasmatiques à jeun reflètent l'homéostasie lipidique globale de l'organisme, il est également indispensable d'étudier les phénomènes d'augmentation et d'accumulation transitoires des lipides circulants, qui ont lieu en réponse à un repas contenant de la matière grasse, nous dévoilant le devenir des graisses ingérées. De nombreuses études ont alors exploré le métabolisme postprandial des lipides exogènes (apportés par l'alimentation), en faisant varier leur quantité mais aussi leur qualité compte tenu de l'utilisation grandissante de sources de matières grasses variées, aux profils en acides gras différents. Il a ainsi été mis en évidence, notamment chez des sujets sains, des différences de métabolisation entre des quantités variables de lipides mais aussi entre des acides gras saturés ou insaturés, comme décrit en 4.1.2.

En parallèle, de nouvelles recherches se sont portées sur un autre facteur, touchant cette fois-ci à la physico-chimie des lipides, qui correspond à la structure des lipides. En effet, les

lipides se présentent sous diverses structures moléculaire et supramoléculaire dans les aliments, ce qui peut affecter leur assimilation. La structure émulsionnée est l'une des plus représentées ; les lipides se retrouvent alors sous la forme de gouttelettes dispersées dans un milieu aqueux. L'émulsification est d'ailleurs le processus initial qui a lieu de manière grossière dans notre estomac afin d'optimiser la digestion puis l'absorption des lipides. Il a ainsi été montré que l'émulsification préalable des lipides induisait une lipémie plus précoce par rapport à celle observée pour des lipides non-émulsionnés. Dans notre étude Lipinflox, nous confirmons cet effet de l'émulsification de la matière grasse sur la lipémie mais, pour la première fois à notre connaissance, en utilisant un repas complexe en situation de consommation normale (petit-déjeuner) contrairement aux précédentes études relatées dans la littérature (avec bolus d'huile, parfois donné en intragastrique). De plus, nous avons réalisé cette étude en partie chez des individus obèses modérés, pour qui nous avons observé un réel impact de l'émulsification de la matière grasse sur la lipémie postprandiale compte tenu de la difficulté observée pour ces personnes à amorcer la digestion de la même quantité de lipides non émulsionnés. Suite à la consommation de l'émulsion, les obèses voient leur lipémie augmenter rapidement pour atteindre un pic, qui est alors rapidement éliminé, comme pour les sujets normo-pondérés. Ce n'est alors pas le cas suite à la consommation de la tartine, pour laquelle les obèses présentent une difficulté à amorcer la digestion et voit leur lipémie augmentée et maintenue élevée le reste de la journée. Les sujets normo-pondérés ne montrent pas une telle difficulté à digérer les 40 g de matière grasse tartinée ; même si leur lipémie reste moins précoce et moins élevée durant les premières heures suivant la consommation de la tartine par comparaison à celle observée suite à l'émulsion, les lipémies respectives redeviennent similaires au bout de 240 minutes et aucune différence d'accumulation plasmatique de triglycérides (aire sous courbe) n'a été relevée sur les différentes périodes postprandiales étudiées pour ces individus de poids normal. Cependant, la prise d'un second repas peu de temps après le premier pic de lipémie (dû au petit-déjeuner) provoque une nouvelle augmentation de la lipémie, ne permettant pas au taux plasmatique de triglycérides des chylomicrons de retourner à la normale et pouvant ainsi participer à l'absence de différence d'aires sous courbes, notamment sur la matinée. En revanche, chez l'obèse, les différences de lipémie entre petits-déjeuners sont telles qu'une accumulation lipidique significativement supérieure est observée dans le cas de l'émulsion.

Par ailleurs, les différences des cinétiques de lipémie observées entre la tartine et l'émulsion (chez les deux groupes) peuvent s'expliquer par la plus grande surface de matière

grasse disponible pour les enzymes lipolytiques lorsque la matière grasse est émulsionnée, entraînant une digestion plus rapide et certainement une absorption facilitée. Cependant, une vidange gastrique ralentie a été décrite lors de la digestion d'une émulsion (Armand *et al.* 1999), en raison de l'arrivée soudaine des acides gras libres dans le duodénum qui stimule la sécrétion de CCK, inhibant alors la vidange gastrique. Des mesures complémentaires de la CCK ou encore du peptide glucagon-like peptide-1 (GLP-1), tous deux reconnus comme inhibiteurs de la vidange gastrique (Chaudhri *et al.* 2006), seraient à l'avenir un bon complément d'information. Il serait également envisageable de donner aux sujets du paracétamol, avant le repas test, pour évaluer la vidange gastrique, car celle-ci s'avère ralentie lorsque l'absorption intestinale du paracétamol est diminuée.

Nous avons également mis en évidence la sécrétion de chylomicrons de taille différente entre les groupes de sujets, et selon la quantité et la structure des lipides ingérés. Ces résultats soulèvent la nécessité de la mise en place d'études mécanistiques afin de mieux comprendre les différences qui s'opèrent entre normo-pondérés et obèses quant à la sécrétion intestinale et à la structure de leurs chylomicrons respectifs.

D'autre part, au-delà de la lipémie postprandiale, nous avons exploré le devenir métabolique des acides gras alimentaires. Nous avons ainsi montré, pour la première fois à notre connaissance, que (i) la source d'acides gras beta-oxydés était différente (exogènes vs endogènes) selon la structure de la matière grasse ingérée et (ii), avec l'émulsion, les acides gras exogènes ingérés au petit-déjeuner sont préférentiellement beta-oxydés tandis qu'avec la forme tartinée, les acides gras exogènes du petit-déjeuner ont davantage été orientés vers des voies de stockage, et ce d'autant plus chez les sujets obèses. Ces résultats sont ainsi très encourageants, notamment chez l'obèse qui peut présenter des difficultés à oxyder les lipides en aigu.

L'émulsification préalable de la matière grasse semble être un moyen judicieux pour mieux contrôler la lipémie et orienter les acides gras vers la beta-oxydation, ce qui peut être considéré comme une utilisation métabolique souhaitable des acides gras saturés à chaînes longues, notamment chez les sujets présentant des désordres métaboliques. D'après la littérature, une absorption plus importante d'acides gras polyinsaturés (indispensables) a été observée au bout de 9 heures, lorsque les lipides étaient préalablement émulsionnés (Garaiova *et al.* 2007). Les auteurs se sont arrêtés au suivi plasmatique des acides gras indispensables et n'ont pas cherché à caractériser le devenir métabolique de ces acides gras. D'après nos propres résultats, nous pouvons alors penser que les acides gras indispensables pré-

émulsionnés, certes mieux absorbés, ont ensuite été préférentiellement beta-oxydés et ainsi utilisés pour la formation d'ATP, et non utilisés pour le renouvellement des acides gras des phospholipides membranaires. La biodisponibilité des acides gras indispensables pourrait ainsi être en partie remise en cause par leur émulsification préalable : cette hypothèse devrait être testée dans de futurs travaux visant à optimiser les apports en acides gras indispensables.

L'étude Lipinflox constitue une preuve de concept quant à l'impact métabolique de la structure émulsionnée des lipides chez l'Homme. Une modulation de la lipémie et de la proportion des acides gras exogènes beta-oxydés est rendue possible grâce à l'émulsification des lipides, et ce d'autant plus chez l'obèse. Un futur protocole d'intervention serait à envisager, en chronique, avec une consommation quotidienne de lipides émulsionnés ou non au petit-déjeuner. Ceci nous permettrait de vérifier les conséquences à long terme d'une modulation quotidienne de la cinétique de lipémie postprandiale et de la beta-oxydation associée des acides gras. D'autre part, comme notre étude *in vitro* le suggère, il serait pertinent de comparer les effets métaboliques de différentes structures et compositions d'émulsions chez l'Homme, en aigu et en chronique. Enfin, de futures études devraient également porter sur des volontaires femmes et/ou plus âgés.

Métabolisme lipidique, obésité et inflammation métabolique : sur la piste des endotoxines

Il est désormais clairement établi que l'ingestion chronique d'une alimentation déséquilibrée et riche en graisses se caractérise par le développement, à terme, d'une obésité, elle-même étroitement liée à un état inflammatoire de faible intensité et à une augmentation des LPS circulants, qualifiée d'endotoxémie métabolique. Cette endotoxémie a notamment été révélée au cours de la digestion d'un repas riche en lipides (cf. Chap.1, § 5.2.3). Nous retrouvons une endotoxémie plasmatique transitoirement augmentée suite à la consommation de lipides et montrons, chez les obèses, une accumulation postprandiale plus importante de LPS dans la circulation sanguine suite à des doses croissantes en lipides ingérés. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la quantité ou de la structuration de la matière grasse sur profils de cinétiques d'absorption de LPS lors de tests de digestion réalisés suite à des périodes d'intervention nutritionnelle.

En ayant mis en place des études basées sur des tests de digestion, notre attention s'est portée sur la caractérisation de l'endotoxémie métabolique postprandiale, relayée en partie par

les lipoprotéines spécifiques de la phase postprandiale que sont les chylomicrons, comme nous le montrons chez l'obèse. D'autres transporteurs plasmatiques, tels que la LBP ou le sCD14, interviennent aussi durant cette phase afin de prendre en charge les LPS circulants, pouvant aboutir à une résultante davantage pro-inflammatoire ou davantage détoxifiante, selon la nature du transporteur. Nos résultats sur la cohorte incomplète de l'étude Bibop révèlent des variations plasmatiques (à jeun et en postprandial) importantes de ces transporteurs chez des patients souffrant d'obésité morbide, suite à leur opération de by-pass gastrique. Ceci suggère l'importance métabolique des transporteurs d'endotoxines, qui devrait être confirmée par la poursuite de l'étude. Des dosages complémentaires des cytokines plasmatiques IL-6 et TNF- α sont également prévus afin de mieux caractériser la réponse inflammatoire. Par ailleurs, notre équipe a précédemment montré que la qualité du régime alimentaire, du point de vue de la composition des huiles, peut moduler les transporteurs d'endotoxines (Laugerette *et al.* 2012) ; il serait alors important de mettre en place, à l'avenir, une étude d'intervention nutritionnelle chez des patients opérés d'une chirurgie bariatrique afin d'optimiser leur nutrition *via* la qualité des acides gras ingérés, mais aussi *via* la structuration des acides gras dans les aliments compte tenu des résultats préliminaires de l'étude Bibop.

Certains travaux de la littérature mettent en avant qu'une absorption accrue d'endotoxines est également possible en raison d'une augmentation de la perméabilité intestinale (Cani *et al.* 2008; de La Serre *et al.* 2010). Il a aussi été récemment montré qu'une perméabilité intestinale augmentée était associée à l'adiposité viscérale chez des femmes en bonne santé (de poids normal et en surpoids) (Gummesson *et al.* 2011). Parmi les facteurs impliqués dans l'augmentation de la perméabilité intestinale, on retrouve une composition altérée du microbiote intestinal (dysbiose) ainsi qu'une consommation chronique d'aliments riches en lipides (Cani *et al.* 2010; Frazier *et al.* 2011). Ces deux facteurs sont retrouvés en situation d'obésité, pouvant expliquer une perméabilité intestinale plus importante chez l'obèse ainsi qu'une endotoxémie métabolique à jeun plus élevée chez ces individus. L'implication de l'hormone GLP-2 a aussi été mise en évidence récemment, compte tenu de son rôle dans le maintien de la fonction barrière de l'intestin, induite par les prébiotiques (Cani *et al.* 2009). Dans le cadre de l'étude Lipinflox, nous n'avons toutefois pas relevé de différence d'endotoxémie basale entre les obèses modérés et les normo-pondérés, suggérant que les sujets étudiés ne présentaient pas d'altération critique de perméabilité intestinale. En revanche, nous montrons pour la première fois, à notre connaissance, des différences

d'accumulation postprandiale d'endotoxines, en lien avec les chylomicrons, chez les obèses modérés et non chez les sujets normo-pondérés.

Enfin, il est important de souligner que, dans de nombreuses études, les régimes ou repas testés sont très souvent déséquilibrés. L'effet néfaste des lipides est mis en avant mais il ne faut pas oublier que de tels régimes sont, par exemple, pauvres en fibres mais aussi très riches en glucides (saccharose, fructose). Ghanim et ses collaborateurs ont ainsi montré qu'un repas riche en fruits et en fibres (contenant 17 % de lipides) n'induisait aucune augmentation postprandiale d'endotoxines et de LBP circulantes, contrairement à un repas riche en graisses et en sucres (Ghanim *et al.* 2009). Très récemment, il a aussi été mis en évidence qu'un régime à l'occidentale de 4 semaines ("Western diet"; 40 % lipides, 40% glucides et 20 % protéines) induit une augmentation de l'endotoxémie métabolique contrairement à un régime plus équilibré, et notamment plus riche en omégas 3 et vitamines (appelé "prudent-style diet"; 20 % lipides, 60% glucides et 20 % protéines) (Pendyala *et al.* 2012). Dogan et ses collaborateurs ont commenté cet article en précisant que les régimes occidentaux, certes plus riches en acides gras saturés, contiennent également des sucres simples, et notamment du fructose qui peut participer à l'augmentation d'endotoxémie observée (Dogan *et al.* 2012).

Ainsi, l'étude des phénomènes ayant lieu au cours de la phase postprandiale, suite à la consommation de différentes qualités et structures de lipides, représente un nouveau challenge dans l'étiologie des désordres métaboliques, se devant d'être placée dans un contexte d'équilibre chronique des régimes alimentaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Abumrad**, N. A., M. R. el-Maghrabi, E. Z. Amri, E. Lopez and P. A. Grimaldi (1993). "Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36." *J Biol Chem* **268**(24): 17665-17668.
- Achten**, J. and A. E. Jeukendrup (2004). "Optimizing fat oxidation through exercise and diet." *Nutrition* **20**(7-8): 716-727.
- Adams**, K. F., A. Schatzkin, T. B. Harris, V. Kipnis, T. Mouw, R. Ballard-Barbash, A. Hollenbeck and M. F. Leitzmann (2006). "Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old." *N Engl J Med* **355**(8): 763-778.
- Ajuwon**, K. M. and M. E. Spurlock (2005). "Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes." *J Nutr* **135**(8): 1841-1846.
- Alberti**, K. G., P. Zimmet and J. Shaw (2005). "The metabolic syndrome--a new worldwide definition." *Lancet* **366**(9491): 1059-1062.
- Aljada**, A., P. Mohanty, H. Ghanim, T. Abdo, D. Tripathy, A. Chaudhuri and P. Dandona (2004). "Increase in intranuclear nuclear factor kappaB and decrease in inhibitor kappaB in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect." *Am J Clin Nutr* **79**(4): 682-690.
- Alvarez**, J. A., P. B. Higgins, R. A. Oster, J. R. Fernandez, B. E. Darnell and B. A. Gower (2009). "Fasting and postprandial markers of inflammation in lean and overweight children." *Am J Clin Nutr* **89**(4): 1138-1144.
- Amar**, J., R. Burcelin, J. B. Ruidavets, P. D. Cani, J. Fauvel, M. C. Alessi, B. Chamontin and J. Ferrieres (2008). "Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men." *Am J Clin Nutr* **87**(5): 1219-1223.
- Antoun**, E., I. Momken, A. Bergouignan, C. Villars, C. Platat, D. A. Schoeller, S. Blanc and C. Simon (2010). "The [1-13C]acetate recovery factor to correct tracer-derived dietary fat oxidation is lower in overweight insulin-resistant subjects." *The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* **5**(4): 173-179.
- Armand**, M. (2007). "Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand?" *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**(2): 156-164.
- Armand**, M. (2008). *Digestibilité des matières grasses chez l'homme*.
- Armand**, M., P. Borel, B. Pasquier, C. Dubois, M. Senft, M. Andre, J. Peyrot, J. Salducci and D. Lairon (1996). "Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum." *Am J Physiol* **271**(1 Pt 1): G172-183.
- Armand**, M., B. Pasquier, M. Andre, P. Borel, M. Senft, J. Peyrot, J. Salducci, H. Portugal, V. Jaussan and D. Lairon (1999). "Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract." *Am J Clin Nutr* **70**(6): 1096-1106.
- Arumugam**, M., J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D. R. Mende, G. R. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, J. M. Batto, M. Bertalan, N. Borruel, F. Casellas, L. Fernandez, L. Gautier, T. Hansen, M. Hattori, T. Hayashi, M. Kleerebezem, K. Kurokawa, M. Leclerc, F. Levenez, C. Manichanh, H. B. Nielsen, T. Nielsen, N. Pons, J. Poulain, J. Qin, T. Sicheritz-Ponten, S. Tims, D. Torrents, E. Ugarte, E. G. Zoetendal, J. Wang, F. Guarner, O. Pedersen, W. M. de Vos, S. Brunak, J. Dore, H. I. T. C. Meta, M. Antolin, F. Artiguenave, H. M. Blottiere, M. Almeida, C. Brechot, C. Cara, C. Chervaux, A. Cultrone, C. Delorme, G. Denariatz, R. Dervyn, K. U. Foerstner, C. Friss, M. van de Guchte, E. Guedon, F. Haimet, W. Huber, J. van Hylckama-Vlieg, A. Jamet, C. Juste, G. Kaci, J. Knol, O. Lakhdari, S. Layec, K. Le Roux, E. Maguin, A. Merieux, R. Melo Minardi, C. M'Rini, J. Muller, R. Oozeer, J. Parkhill, P. Renault, M. Rescigno, N. Sanchez, S. Sunagawa, A. Torrejon, K. Turner, G.

- Vandemeulebrouck, E. Varela, Y. Winogradsky, G. Zeller, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich and P. Bork (2011). "Enterotypes of the human gut microbiome." *Nature* **473**(7346): 174-180.
- Astrup**, A., J. Dyerberg, P. Elwood, K. Hermansen, F. B. Hu, M. U. Jakobsen, F. J. Kok, R. M. Krauss, J. M. Lecerf, P. LeGrand, P. Nestel, U. Riserus, T. Sanders, A. Sinclair, S. Stender, T. Tholstrup and W. C. Willett (2011). "The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010?" *Am J Clin Nutr* **93**(4): 684-688.
- Backhed**, F., R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson and J. I. Gordon (2005). "Host-bacterial mutualism in the human intestine." *Science* **307**(5717): 1915-1920.
- Backhed**, F., J. K. Manchester, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon (2007). "Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(3): 979-984.
- Baer**, D. J., J. T. Judd, P. M. Kris-Etherton, G. Zhao and E. A. Emken (2003). "Stearic acid absorption and its metabolizable energy value are minimally lower than those of other fatty acids in healthy men fed mixed diets." *J Nutr* **133**(12): 4129-4134.
- Basdevant**, A., M. Laville and L. E. (2001). *Traité de Nutrition clinique de l'adulte*.
- Bastard, J. P., C. Jardel, J. Delattre, B. Hainque, E. Bruckert and F. Oberlin (1999). "Evidence for a link between adipose tissue interleukin-6 content and serum C-reactive protein concentrations in obese subjects." *Circulation* **99**(16): 2221-2222.
- Bateman**, P. A., K. G. Jackson, V. Maitin, P. Yaqoob and C. M. Williams (2007). "Differences in cell morphology, lipid and apo B secretory capacity in caco-2 cells following long term treatment with saturated and monounsaturated fatty acids." *Biochim Biophys Acta* **1771**(4): 475-485.
- Beigneux**, A. P., B. S. Davies, P. Gin, M. M. Weinstein, E. Farber, X. Qiao, F. Peale, S. Bunting, R. L. Walzem, J. S. Wong, W. S. Blaner, Z. M. Ding, K. Melford, N. Wongsirirot, X. Shu, F. de Sauvage, R. O. Ryan, L. G. Fong, A. Bensadoun and S. G. Young (2007). "Glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 plays a critical role in the lipolytic processing of chylomicrons." *Cell Metab* **5**(4): 279-291.
- Bellido**, C., J. Lopez-Miranda, L. M. Blanco-Colio, P. Perez-Martinez, F. J. Muriana, J. L. Martin-Ventura, C. Marin, P. Gomez, F. Fuentes, J. Egido and F. Perez-Jimenez (2004). "Butter and walnuts, but not olive oil, elicit postprandial activation of nuclear transcription factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells from healthy men." *Am J Clin Nutr* **80**(6): 1487-1491.
- Benaiges**, D., J. A. Flores-Le-Roux, J. Pedro-Botet, J. M. Ramon, A. Parri, M. Villatoro, M. J. Carrera, M. Pera, E. Sagarra, L. Grande and A. Goday (2012). "Impact of Restrictive (Sleeve Gastrectomy) vs Hybrid Bariatric Surgery (Roux-en-Y Gastric Bypass) on Lipid Profile." *Obes Surg* **22**(8): 1268-1275.
- Bergo**, M., G. Olivecrona and T. Olivecrona (1996). "Diurnal rhythms and effects of fasting and refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase." *Am J Physiol* **271**(6 Pt 1): E1092-1097.
- Bergouignan**, A., G. Trudel, C. Simon, A. Chopard, D. A. Schoeller, I. Momken, S. B. Votruba, M. Desage, G. C. Burdge, G. Gauquelin-Koch, S. Normand and S. Blanc (2009). "Physical inactivity differentially alters dietary oleate and palmitate trafficking." *Diabetes* **58**(2): 367-376.
- Bernet**, M. F., D. Brassart, J. R. Neeser and A. L. Servin (1994). "Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria." *Gut* **35**(4): 483-489.
- Berry**, S. E. (2009). "Triacylglycerol structure and interesterification of palmitic and stearic acid-rich fats: an overview and implications for cardiovascular disease." *Nutr Res Rev* **22**(1): 3-17.
- Berry**, S. E., G. J. Miller and T. A. Sanders (2007). "The solid fat content of stearic acid-rich fats determines their postprandial effects." *Am J Clin Nutr* **85**(6): 1486-1494.
- Berry**, S. E. and T. A. Sanders (2005). "Influence of triacylglycerol structure of stearic acid-rich fats on postprandial lipaemia." *Proc Nutr Soc* **64**(2): 205-212.

- Bessesen**, D. H., C. L. Rupp and R. H. Eckel (1995). "Dietary fat is shunted away from oxidation, toward storage in obese Zucker rats." Obes Res **3**(2): 179-189.
- Binnert**, C., C. Pachiaudi, M. Beylot, M. Croset, R. Cohen, J. P. Riou and M. Laville (1996). "Metabolic fate of an oral long-chain triglyceride load in humans." Am J Physiol **270**(3 Pt 1): E445-450.
- Binnert**, C., C. Pachiaudi, M. Beylot, D. Hans, J. Vandermander, P. Chantre, J. P. Riou and M. Laville (1998). "Influence of human obesity on the metabolic fate of dietary long- and medium-chain triacylglycerols." Am J Clin Nutr **67**(4): 595-601.
- Bistrrian**, B. R. and L. Khaodhiar (2000). "Chronic systemic inflammation in overweight and obese adults." JAMA **283**(17): 2235; author reply 2236.
- Black**, A. E., W. A. Coward, T. J. Cole and A. M. Prentice (1996). "Human energy expenditure in affluent societies: an analysis of 574 doubly-labelled water measurements." Eur J Clin Nutr **50**(2): 72-92.
- Black**, D. D. (2007). "Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **293**(3): G519-524.
- Blackburn**, P., J. P. Despres, B. Lamarche, A. Tremblay, J. Bergeron, I. Lemieux and C. Couillard (2006). "Postprandial variations of plasma inflammatory markers in abdominally obese men." Obesity (Silver Spring) **14**(10): 1747-1754.
- Blackwell**, T. S. and J. W. Christman (1996). "Sepsis and cytokines: current status." Br J Anaesth **77**(1): 110-117.
- Bluher**, M. (2010). "The distinction of metabolically 'healthy' from 'unhealthy' obese individuals." Curr Opin Lipidol **21**(1): 38-43.
- Bonanome**, A. and S. M. Grundy (1988). "Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels." N Engl J Med **318**(19): 1244-1248.
- Bongard**, S., A. Meynier, A. Riaublanc and C. Genot (2006). The molecular organization of dairy matrices influences partitioning and release of aroma compounds.
- Bonnaire**, L., S. Sandra, T. Helgason, E. A. Decker, J. Weiss and D. J. McClements (2008). "Influence of lipid physical state on the in vitro digestibility of emulsified lipids." J Agric Food Chem **56**(10): 3791-3797.
- Bonnet**, M., M. Cansell, A. Berkaoui, M. Ropers, M. Anton and F. Leal-Calderon (2009). "Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions." Food Hydrocolloids **23**: 92-101.
- Borel**, P., M. Armand, P. Ythier, G. Dutot, C. Melin, M. Senft, H. Lafont and D. Lairon (1994). "Hydrolysis of emulsions with different triglycerides and droplet sizes by gastric lipase in vitro. Effect on pancreatic lipase activity." J Nutr Biochem **5**: 124-133.
- Borgstrom**, B. (1975). "On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts." J Lipid Res **16**(6): 411-417.
- Borgstrom**, B., A. Dahlqvist, G. Lundh and J. Sjovall (1957). "Studies of intestinal digestion and absorption in the human." J Clin Invest **36**(10): 1521-1536.
- Borst**, S. E. and C. F. Conover (2005). "High-fat diet induces increased tissue expression of TNF-alpha." Life Sci **77**(17): 2156-2165.
- Braun**, J. E. and D. L. Severson (1992). "Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase." Biochem J **287** (Pt 2): 337-347.
- Brown**, W. V. and M. L. Baginsky (1972). "Inhibition of lipoprotein lipase by an apoprotein of human very low density lipoprotein." Biochem Biophys Res Commun **46**(2): 375-382.

- Burns, A. A., M. B. Livingstone, R. W. Welch, A. Dunne, P. J. Robson, L. Lindmark, C. A. Reid, U. Mullaney and I. R. Rowland (2000).** "Short-term effects of yoghurt containing a novel fat emulsion on energy and macronutrient intakes in non-obese subjects." *Int J Obes Relat Metab Disord* **24**(11): 1419-1425.
- Burns, A. A., M. B. Livingstone, R. W. Welch, A. Dunne and I. R. Rowland (2002).** "Dose-response effects of a novel fat emulsion (Olibra) on energy and macronutrient intakes up to 36 h post-consumption." *Eur J Clin Nutr* **56**(4): 368-377.
- Campeotto, F., A. J. Waligora-Dupriet, F. Doucet-Populaire, N. Kalach, C. Dupont and M. J. Butel (2007).** "[Establishment of the intestinal microflora in neonates]." *Gastroenterol Clin Biol* **31**(5): 533-542.
- Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, A. M. Neyrinck, F. Fava, K. M. Tuohy, C. Chabo, A. Waget, E. Delmee, B. Cousin, T. Sulpice, B. Chamontin, J. Ferrieres, J. F. Tanti, G. R. Gibson, L. Casteilla, N. M. Delzenne, M. C. Alessi and R. Burcelin (2007).** "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* **56**(7): 1761-1772.
- Cani, P. D., R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne and R. Burcelin (2008).** "Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice." *Diabetes* **57**(6): 1470-1481.
- Cani, P. D. and N. M. Delzenne (2010).** "Impact du microbiote intestinal sur la perméabilité intestinale et les désordres métaboliques liés à l'obésité." *Louvain Med* **129**(3): S8-10.
- Cani, P. D., A. M. Neyrinck, F. Fava, C. Knauf, R. G. Burcelin, K. M. Tuohy, G. R. Gibson and N. M. Delzenne (2007).** "Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia." *Diabetologia* **50**(11): 2374-2383.
- Cani, P. D., S. Possemiers, T. Van de Wiele, Y. Guiot, A. Everard, O. Rottier, L. Geurts, D. Naslain, A. Neyrinck, D. M. Lambert, G. G. Muccioli and N. M. Delzenne (2009).** "Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability." *Gut* **58**(8): 1091-1103.
- Caroff, M. and D. Karibian (2003).** "Structure of bacterial lipopolysaccharides." *Carbohydr Res* **338**(23): 2431-2447.
- Carriere, F., J. A. Barrowman, R. Verger and R. Laugier (1993).** "Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans." *Gastroenterology* **105**(3): 876-888.
- Carriere, F., P. Grandval, C. Renou, A. Palomba, F. Prieri, J. Giallo, F. Henniges, S. Sander-Struckmeier and R. Laugier (2005).** "Quantitative study of digestive enzyme secretion and gastrointestinal lipolysis in chronic pancreatitis." *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**(1): 28-38.
- Carriere, F., C. Renou, V. Lopez, J. De Caro, F. Ferrato, H. Lengsfeld, A. De Caro, R. Laugier and R. Verger (2000).** "The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals." *Gastroenterology* **119**(4): 949-960.
- Castell, J. V., M. J. Gomez-Lechon, M. David, R. Fabra, R. Trullenque and P. C. Heinrich (1990).** "Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6." *Hepatology* **12**(5): 1179-1186.
- Chale-Rush, A., J. R. Burgess and R. D. Mattes (2007).** "Evidence for human orosensory (taste?) sensitivity to free fatty acids." *Chem Senses* **32**(5): 423-431.
- Chapman, M. J., H. N. Ginsberg, P. Amarengo, F. Andreotti, J. Boren, A. L. Catapano, O. S. Descamps, E. Fisher, P. T. Kovanen, J. A. Kuivenhoven, P. Lesnik, L. Masana, B. G. Nordestgaard, K. K. Ray, Z. Reiner, M. R. Taskinen, L. Tokgozoglu, A. Tybjaerg-Hansen, G. F. Watts and P. European Atherosclerosis Society Consensus (2011).** "Triglyceride-rich lipoproteins and high-density

lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management." *Eur Heart J* **32**(11): 1345-1361.

Charriere, S., N. Peretti, S. Bernard, M. Di Filippo, A. Sassolas, M. Merlin, M. Delay, C. Debard, E. Lefai, A. Lachaux, P. Moulin and C. Marcais (2011). "GPIHBP1 C89F neomutation and hydrophobic C-terminal domain G175R mutation in two pedigrees with severe hyperchylomicronemia." *J Clin Endocrinol Metab* **96**(10): E1675-1679.

Chateau, D., T. Pauquai, F. Delers, M. Rousset, J. Chambaz and S. Demignot (2005). "Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells." *J Cell Physiol* **202**(3): 767-776.

Chaudhri, O., C. Small and S. Bloom (2006). "Gastrointestinal hormones regulating appetite." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**(1471): 1187-1209.

Chavez-Jauregui, R. N., R. D. Mattes and E. J. Parks (2010). "Dynamics of fat absorption and effect of sham feeding on postprandial lipema." *Gastroenterology* **139**(5): 1538-1548.

Chevallier, M. (2010). "Techniques des by-pass gastriques pour obésité." *EM consulte* **40-390**.

Chow, S. L. and D. Hollander (1979). "Linoleic acid absorption in the unanesthetized rat: mechanism of transport and influence of luminal factors on absorption." *Lipids* **14**(4): 378-385.

Christensen, M. S., C. E. Hoy, C. C. Becker and T. G. Redgrave (1995). "Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure." *Am J Clin Nutr* **61**(1): 56-61.

Christl, S. U., P. R. Murgatroyd, G. R. Gibson and J. H. Cummings (1992). "Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine." *Gastroenterology* **102**(4 Pt 1): 1269-1277.

Ciapaite, J., J. van Bezu, G. van Eikenhorst, S. J. Bakker, T. Teerlink, M. Diamant, R. J. Heine, K. Krab, H. V. Westerhoff and C. G. Schalkwijk (2007). "Palmitate and oleate have distinct effects on the inflammatory phenotype of human endothelial cells." *Biochim Biophys Acta* **1771**(2): 147-154.

Clemente-Postigo, M., M. I. Queipo-Ortuno, M. Murri, M. Boto-Ordonez, P. Perez-Martinez, C. Andres-Lacueva, F. Cardona and F. J. Tinahones (2012). "Endotoxin increase after fat overload is related to postprandial hypertriglyceridemia in morbidly obese patients." *J Lipid Res* **53**(5): 973-978.

Cohen, J. C. and G. M. Berger (1990). "Effects of glucose ingestion on postprandial lipemia and triglyceride clearance in humans." *J Lipid Res* **31**(4): 597-602.

Cohen, J. C., T. D. Noakes and A. J. Benade (1988). "Serum triglyceride responses to fatty meals: effects of meal fat content." *Am J Clin Nutr* **47**(5): 825-827.

Coppack, S. W., M. D. Jensen and J. M. Miles (1994). "In vivo regulation of lipolysis in humans." *J Lipid Res* **35**(2): 177-193.

Couet, C., J. Delarue, P. Ritz, J. M. Antoine and F. Lamisse (1997). "Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults." *Int J Obes Relat Metab Disord* **21**(8): 637-643.

Couillard, C., N. Bergeron, D. Prud'homme, J. Bergeron, A. Tremblay, C. Bouchard, P. Mauriege and J. P. Despres (1998). "Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men." *Diabetes* **47**(6): 953-960.

Couillard, C., N. Bergeron, D. Prud'homme, J. Bergeron, A. Tremblay, C. Bouchard, P. Mauriege and J. P. Despres (1999). "Gender difference in postprandial lipemia : importance of visceral adipose tissue accumulation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(10): 2448-2455.

Creely, S. J., P. G. McTernan, C. M. Kusminski, M. Fisher, N. F. Da Silva, M. Khanolkar, M. Evans, A. L. Harte and S. Kumar (2007). "Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**(3): E740-747.

- Cummings, J. H.** and H. N. Englyst (1987). "Fermentation in the human large intestine and the available substrates." *Am J Clin Nutr* **45**(5 Suppl): 1243-1255.
- Cummings, J. H., E. W. Pomare, W. J. Branch, C. P. Naylor and G. T. Macfarlane** (1987). "Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood." *Gut* **28**(10): 1221-1227.
- Dallongeville, J.** (2006). "Le métabolisme des lipoprotéines." *Cah. Nutr. Diét.* **41**(1).
- Dandona, P., A. Aljada, P. Mohanty, H. Ghanim, W. Hamouda, E. Assian and S. Ahmad** (2001). "Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect?" *J Clin Endocrinol Metab* **86**(7): 3257-3265.
- Dandona, P., R. Weinstock, K. Thusu, E. Abdel-Rahman, A. Aljada and T. Wadden** (1998). "Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss." *J Clin Endocrinol Metab* **83**(8): 2907-2910.
- de La Serre, C. B., C. L. Ellis, J. Lee, A. L. Hartman, J. C. Rutledge and H. E. Raybould** (2010). "Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**(2): G440-448.
- DeFilippis, A. P.** and L. S. Sperling (2006). "Understanding omega-3's." *Am Heart J* **151**(3): 564-570.
- Dekker, M. J., A. J. Wright, V. C. Mazurak, A. G. Marangoni, J. W. Rush, T. E. Graham and L. E. Robinson** (2009). "Fasting triacylglycerol status, but not polyunsaturated/saturated fatty acid ratio, influences the postprandial response to a series of oral fat tolerance tests." *J Nutr Biochem* **20**(9): 694-704.
- Delorme, V., R. Dhouib, S. Canaan, F. Fotiadu, F. Carriere and J. F. Cavalier** (2011). "Effects of surfactants on lipase structure, activity, and inhibition." *Pharm Res* **28**(8): 1831-1842.
- DeNigris, S. J., M. Hamosh, D. K. Kasbekar, C. S. Fink, T. C. Lee and P. Hamosh** (1985). "Secretion of human gastric lipase from dispersed gastric glands." *Biochim Biophys Acta* **836**(1): 67-72.
- Deopurkar, R., H. Ghanim, J. Friedman, S. Abuaysheh, C. L. Sia, P. Mohanty, P. Viswanathan, A. Chaudhuri and P. Dandona** (2010). "Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3." *Diabetes Care* **33**(5): 991-997.
- Ding, S.** and P. K. Lund (2011). "Role of intestinal inflammation as an early event in obesity and insulin resistance." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14**(4): 328-333.
- Dogan, S., M. Celikbilek and K. Guven** (2012). "High Fructose Consumption Can Induce Endotoxemia." *Gastroenterology*.
- Dubern, B.** and K. Clement (2007). "[Genetic aspects of obesity]." *Presse Med* **36**(11 Pt 2): 1598-1605.
- Dubois, C., M. Armand, N. Mekki, H. Portugal, A. M. Pauli, P. M. Bernard, H. Lafont and D. Lairon** (1994). "Effects of increasing amounts of dietary cholesterol on postprandial lipemia and lipoproteins in human subjects." *J Lipid Res* **35**(11): 1993-2007.
- Dubois, C., G. Beaumier, C. Juhel, M. Armand, H. Portugal, A. M. Pauli, P. Borel, C. Latge and D. Lairon** (1998). "Effects of graded amounts (0-50 g) of dietary fat on postprandial lipemia and lipoproteins in normolipidemic adults." *Am J Clin Nutr* **67**(1): 31-38.
- Duncan, S. H., G. E. Loble, G. Holtrop, J. Ince, A. M. Johnstone, P. Louis and H. J. Flint** (2008). "Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss." *Int J Obes (Lond)* **32**(11): 1720-1724.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson and D. A. Relman** (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." *Science* **308**(5728): 1635-1638.

- Erridge, C., T. Attina, C. M. Spickett and D. J. Webb (2007).** "A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation." *Am J Clin Nutr* **86**(5): 1286-1292.
- Erridge, C. and N. J. Samani (2009).** "Saturated fatty acids do not directly stimulate Toll-like receptor signaling." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(11): 1944-1949.
- Evans, K., G. C. Burdge, S. A. Wootton, M. L. Clark and K. N. Frayn (2002).** "Regulation of dietary fatty acid entrapment in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle." *Diabetes* **51**(9): 2684-2690.
- Evans, K., P. J. Kuusela, M. L. Cruz, I. Wilhelmova, B. A. Fielding and K. N. Frayn (1998).** "Rapid chylomicron appearance following sequential meals: effects of second meal composition." *Br J Nutr* **79**(5): 425-429.
- Fain, J. N., D. S. Tichansky and A. K. Madan (2006).** "Most of the interleukin 1 receptor antagonist, cathepsin S, macrophage migration inhibitory factor, nerve growth factor, and interleukin 18 release by explants of human adipose tissue is by the non-fat cells, not by the adipocytes." *Metabolism* **55**(8): 1113-1121.
- Faraj, M., P. Jones, A. D. Sniderman and K. Cianflone (2001).** "Enhanced dietary fat clearance in postobese women." *J Lipid Res* **42**(4): 571-580.
- Fave, G., C. Leveque, J. Peyrot, G. Pieroni, T. C. Coste and M. Armand (2007).** "Modulation of gastric lipolysis by the phospholipid specie: link to specific lipase-phospholipid interaction at the lipid/water interface?" *FASEB J* **21**(6).
- Favier, C. F., E. E. Vaughan, W. M. De Vos and A. D. Akkermans (2002).** "Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates." *Appl Environ Microbiol* **68**(1): 219-226.
- Fernandez-Real, J. M., S. Perez del Pulgar, E. Luche, J. M. Moreno-Navarrete, A. Waget, M. Serino, E. Soriano, A. Sanchez-Pla, F. C. Pontaque, J. Vendrell, M. R. Chacon, W. Ricart, R. Burcelin and A. Zorzano (2011).** "CD14 modulates inflammation-driven insulin resistance." *Diabetes* **60**(8): 2179-2186.
- Filer, L. J., Jr., F. H. Mattson and S. J. Fomon (1969).** "Triglyceride configuration and fat absorption by the human infant." *J Nutr* **99**(3): 293-298.
- Finley, J. W., L. P. Klemann, G. A. Leveille, M. S. Otterburn and C. G. Walchak (1994).** "Caloric availability of SALATRIM in rats and humans : A potential low-calorie fat substitute." *J Agric Food Chem* **42**(2): 495-499.
- Finley, J. W., G. A. Leveille, R. M. Dixon, C. G. Walchak, J. C. Sourby, R. E. Smith, K. D. Francis and M. S. Otterburn (1994).** "Clinical assessment of Salatrime, a reduced-calorie triacylglycerol." *J Agric Food Chem* **42**(2): 581-596.
- Finucane, M. M., G. A. Stevens, M. J. Cowan, G. Danaei, J. K. Lin, C. J. Paciorek, G. M. Singh, H. R. Gutierrez, Y. Lu, A. N. Bahalim, F. Farzadfar, L. M. Riley and M. Ezzati (2011).** "National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants." *Lancet* **377**(9765): 557-567.
- Fischer, L., C. Hildebrandt, T. Bruckner, H. Kenngott, G. R. Linke, T. Gehrig, M. W. Buchler and B. P. Muller-Stich (2012).** "Excessive weight loss after sleeve gastrectomy: a systematic review." *Obes Surg* **22**(5): 721-731.
- Flatt, J. P., E. Ravussin, K. J. Acheson and E. Jequier (1985).** "Effects of dietary fat on postprandial substrate oxidation and on carbohydrate and fat balances." *J Clin Invest* **76**(3): 1019-1024.
- Fobi, M. A. (2004).** "Surgical treatment of obesity: a review." *J Natl Med Assoc* **96**(1): 61-75.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957).** "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *J Biol Chem* **226**(1): 497-509.

- Frankel, W. L., W. Zhang, A. Singh, D. M. Klurfeld, S. Don, T. Sakata, I. Modlin and J. L. Rombeau** (1994). "Mediation of the trophic effects of short-chain fatty acids on the rat jejunum and colon." Gastroenterology **106**(2): 375-380.
- Franssen, R., H. Monajemi, E. S. Stroes and J. J. Kastelein** (2011). "Obesity and dyslipidemia." Med Clin North Am **95**(5): 893-902.
- Frazier, T. H., J. K. DiBaise and C. J. McClain** (2011). "Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury." JPEN J Parenter Enteral Nutr **35**(5 Suppl): 14S-20S.
- Fried, S. K., D. A. Bunkin and A. S. Greenberg** (1998). "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid." J Clin Endocrinol Metab **83**(3): 847-850.
- Frige, F., M. Laneri, A. Veronelli, F. Folli, M. Paganelli, P. Vedani, M. Marchi, D. Noe, P. Ventura, E. Opocher and A. E. Pontiroli** (2009). "Bariatric surgery in obesity: changes of glucose and lipid metabolism correlate with changes of fat mass." Nutr Metab Cardiovasc Dis **19**(3): 198-204.
- Fugier, C., J. J. Tousaint, X. Prieur, M. Plateroti, J. Samarut and P. Delerive** (2006). "The lipoprotein lipase inhibitor ANGPTL3 is negatively regulated by thyroid hormone." J Biol Chem **281**(17): 11553-11559.
- Furet, J. P., L. C. Kong, J. Tap, C. Poitou, A. Basdevant, J. L. Bouillot, D. Mariat, G. Corthier, J. Dore, C. Henegar, S. Rizkalla and K. Clement** (2010). "Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers." Diabetes **59**(12): 3049-3057.
- Gabert, L., C. Vors, C. Louche-Pelissier, V. Sauvinet, S. Lambert-Porcheron, J. Draï, M. Laville, M. Desage and M. C. Michalski** (2011). "¹³C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1-¹³C₃]tripalmitin and [1,1,1-¹³C₃]triolein." Rapid Commun Mass Spectrom **25**(19): 2697-2703.
- Garaiova, I., I. A. Guschina, S. F. Plummer, J. Tang, D. Wang and N. T. Plummer** (2007). "A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification." Nutr J **6**: 4.
- Gargouri, Y., H. Moreau and R. Verger** (1989). "Gastric lipases: biochemical and physiological studies." Biochim Biophys Acta **1006**(3): 255-271.
- Gautier, T., D. Masson and L. Lagrost** (2010). "Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'Homme." EM consulte **10-368-A-10**.
- Gavin, L. A., F. McMahon and M. Moeller** (1985). "Modulation of adipose lipoprotein lipase by thyroid hormone and diabetes. The significance of the low T3 state." Diabetes **34**(12): 1266-1271.
- Gerard, P., P. Lepercq, M. Leclerc, F. Gavini, P. Raibaud and C. Juste** (2007). "Bacteroides sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces." Appl Environ Microbiol **73**(18): 5742-5749.
- Ghanim, H., S. Abuaysheh, C. L. Sia, K. Korzeniewski, A. Chaudhuri, J. M. Fernandez-Real and P. Dandona** (2009). "Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of Toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal: implications for insulin resistance." Diabetes Care **32**(12): 2281-2287.
- Ghanim, H., A. Aljada, D. Hofmeyer, T. Syed, P. Mohanty and P. Dandona** (2004). "Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state." Circulation **110**(12): 1564-1571.
- Ghanim, H., C. L. Sia, M. Upadhyay, K. Korzeniewski, P. Viswanathan, S. Abuaysheh, P. Mohanty and P. Dandona** (2010). "Orange juice neutralizes the proinflammatory effect of a high-fat, high-carbohydrate meal and prevents endotoxin increase and Toll-like receptor expression." Am J Clin Nutr **91**(4): 940-949.

- Ghoshal, S., J. Witta, J. Zhong, W. de Villiers and E. Eckhardt (2009).** "Chylomicrons promote intestinal absorption of lipopolysaccharides." J Lipid Res **50**(1): 90-97.
- Giacco, R., G. Clemente, L. Busiello, G. Lasorella, A. M. Riviaccio, A. A. Rivellese and G. Riccardi (2004).** "Insulin sensitivity is increased and fat oxidation after a high-fat meal is reduced in normal-weight healthy men with strong familial predisposition to overweight." Int J Obes Relat Metab Disord **28**(2): 342-348.
- Ginsberg, H. N., W. Karmally, M. Siddiqui, S. Holleran, A. R. Tall, S. C. Rumsey, R. J. Deckelbaum, W. S. Blaner and R. Ramakrishnan (1994).** "A dose-response study of the effects of dietary cholesterol on fasting and postprandial lipid and lipoprotein metabolism in healthy young men." Arterioscler Thromb **14**(4): 576-586.
- Gofman, J. W., F. T. Lindgren and H. Elliott (1949).** "Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum." J Biol Chem **179**(2): 973-979.
- Goldberg, I. J., C. A. Scheraldi, L. K. Yacoub, U. Saxena and C. L. Bisgaier (1990).** "Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV." J Biol Chem **265**(8): 4266-4272.
- Golding, M. and T. J. Wooster (2010).** "The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion." Current Opinion in Colloid & Interface Science **15**: 90-101.
- Golding, M., T. J. Wooster, L. Day, M. Xy, L. Lundin, J. Keogh and P. Clifton (2011).** "Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids." Soft Matter **7**: 3513-3523.
- Gormsen, L. C., M. D. Jensen and S. Nielsen (2006).** "Measuring VLDL-triglyceride turnover in humans using ex vivo-prepared VLDL tracer." J Lipid Res **47**(1): 99-106.
- Grundy, S. M. and H. Y. Mok (1976).** "Chylomicron clearance in normal and hyperlipidemic man." Metabolism **25**(11): 1225-1239.
- Guarner, F. and J. R. Malagelada (2003).** "Gut flora in health and disease." Lancet **361**(9356): 512-519.
- Guimbaud, R., J. A. Moreau, M. Bouisson, S. Durand, J. Escourrou, N. Vaysse and J. Frexinos (1997).** "Intraduodenal free fatty acids rather than triglycerides are responsible for the release of CCK in humans." Pancreas **14**(1): 76-82.
- Gummesson, A., L. M. Carlsson, L. H. Storlien, F. Backhed, P. Lundin, L. Lofgren, K. Stenlof, Y. Y. Lam, B. Fagerberg and B. Carlsson (2011).** "Intestinal permeability is associated with visceral adiposity in healthy women." Obesity (Silver Spring) **19**(11): 2280-2282.
- Gutierrez, D. A., M. J. Puglisi and A. H. Hasty (2009).** "Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia." Curr Diab Rep **9**(1): 26-32.
- Haenni, A., B. Sundberg, N. Yazdanpandah, A. Viberg and J. Olsson (2009).** "Effect of fat emulsion (Fabules) on orocecal transit time in healthy men." Scand J Gastroenterol **44**(10): 1186-1190.
- Hamosh, M. (1990).** "Lingual and gastric lipases." Nutrition **6**(6): 421-428.
- Hamosh, M. and R. O. Scow (1973). "Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid." J Clin Invest **52**(1): 88-95.
- Harbis, A., C. Defoort, H. Narbonne, C. Juhel, M. Senft, C. Latge, B. Delenne, H. Portugal, C. Atlan-Gepner, B. Vialettes and D. Lairon (2001).** "Acute hyperinsulinism modulates plasma apolipoprotein B-48 triglyceride-rich lipoproteins in healthy subjects during the postprandial period." Diabetes **50**(2): 462-469.
- Harbis, A., S. Perdreau, S. Vincent-Baudry, M. Charbonnier, M. C. Bernard, D. Raccah, M. Senft, A. M. Lorec, C. Defoort, H. Portugal, S. Vinoy, V. Lang and D. Lairon (2004).** "Glycemic and insulinemic meal responses modulate postprandial hepatic and intestinal lipoprotein accumulation in obese, insulin-resistant subjects." Am J Clin Nutr **80**(4): 896-902.

- Harris**, W. S. and F. Muzio (1993). "Fish oil reduces postprandial triglyceride concentrations without accelerating lipid-emulsion removal rates." Am J Clin Nutr **58**(1): 68-74.
- Harte**, A. L., M. C. Varma, G. Tripathi, K. C. McGee, N. M. Al-Daghri, O. S. Al-Attas, S. Sabico, J. P. O'Hare, A. Ceriello, P. Saravanan, S. Kumar and P. G. McTernan (2012). "High fat intake leads to acute postprandial exposure to circulating endotoxin in type 2 diabetic subjects." Diabetes Care **35**(2): 375-382.
- Hayashi**, A. A., J. Webb, J. Choi, C. Baker, M. Lino, B. Trigatti, K. E. Trajcevski, T. J. Hawke and K. Adeli (2011). "Intestinal SR-BI is upregulated in insulin-resistant states and is associated with overproduction of intestinal apoB48-containing lipoproteins." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **301**(2): G326-337.
- Heath**, R. B., F. Karpe, R. W. Milne, G. C. Burdge, S. A. Wootton and K. N. Frayn (2007). "Dietary fatty acids make a rapid and substantial contribution to VLDL-triacylglycerol in the fed state." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(3): E732-739.
- Hernell**, O., J. E. Stammers and M. C. Carey (1990). "Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings." Biochemistry **29**(8): 2041-2056.
- Hildebrand**, P., C. Beglinger, K. Gyr, J. B. Jansen, L. C. Rovati, M. Zuercher, C. B. Lamers, I. Setnikar and G. A. Stalder (1990). "Effects of a cholecystokinin receptor antagonist on intestinal phase of pancreatic and biliary responses in man." J Clin Invest **85**(3): 640-646.
- Hodson**, L., S. E. McQuaid, S. M. Humphreys, R. Milne, B. A. Fielding, K. N. Frayn and F. Karpe (2010). "Greater dietary fat oxidation in obese compared with lean men: an adaptive mechanism to prevent liver fat accumulation?" Am J Physiol Endocrinol Metab **299**(4): E584-592.
- Hooper**, L. V., J. Xu, P. G. Falk, T. Midtvedt and J. I. Gordon (1999). "A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9833-9838.
- Hotamisligil**, G. S., D. L. Murray, L. N. Choy and B. M. Spiegelman (1994). "Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4854-4858.
- Hsieh**, J., A. A. Hayashi, J. Webb and K. Adeli (2008). "Postprandial dyslipidemia in insulin resistance: mechanisms and role of intestinal insulin sensitivity." Atheroscler Suppl **9**(2): 7-13.
- Hu**, M., Y. S. Li, E. A. Decker and D. J. McClements (2010). "Role of calcium and calcium-binding agents on the lipase digestibility of emulsified lipids using an in vitro digestion model." Hydrocolloids **24**: 719-725.
- Hughes**, T. E., W. V. Sasak, J. M. Ordovas, T. M. Forte, S. Lamon-Fava and E. J. Schaefer (1987). "A novel cell line (Caco-2) for the study of intestinal lipoprotein synthesis." J Biol Chem **262**(8): 3762-3767.
- Hur**, S. J., A. Decker and D. J. McClements (2009). "Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion." Food Chemistry **114**: 253-262.
- Hurley**, J. C. (1995). "Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates." Clin Microbiol Rev **8**(2): 268-292.
- Hussain**, M. M., S. Fatma, X. Pan and J. Iqbal (2005). "Intestinal lipoprotein assembly." Curr Opin Lipidol **16**(3): 281-285.
- Hussain**, M. M., D. K. Strickland and A. Bakillah (1999). "The mammalian low-density lipoprotein receptor family." Annu Rev Nutr **19**: 141-172.
- Innis**, S. M., R. Dyer and C. M. Nelson (1994). "Evidence that palmitic acid is absorbed as sn-2 monoacylglycerol from human milk by breast-fed infants." Lipids **29**(8): 541-545.

- Jackson**, K. G., P. A. Bateman, P. Yaqoob and C. M. Williams (2009). "Impact of saturated, polyunsaturated and monounsaturated fatty acid-rich micelles on lipoprotein synthesis and secretion in Caco-2 cells." *Lipids* **44**(12): 1081-1089.
- Jackson**, K. G., J. M. Knapper-Francis, L. M. Morgan, D. H. Webb, A. Zampelas and C. M. Williams (2003). "Exaggerated postprandial lipaemia and lower post-heparin lipoprotein lipase activity in middle-aged men." *Clin Sci (Lond)* **105**(4): 457-466.
- Jackson**, K. G., E. J. Wolstencroft, P. A. Bateman, P. Yaqoob and C. M. Williams (2005). "Greater enrichment of triacylglycerol-rich lipoproteins with apolipoproteins E and C-III after meals rich in saturated fatty acids than after meals rich in unsaturated fatty acids." *Am J Clin Nutr* **81**(1): 25-34.
- Jandacek**, R. J., J. A. Whiteside, B. N. Holcombe, R. A. Volpenhein and J. D. Taulbee (1987). "The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position." *Am J Clin Nutr* **45**(5): 940-945.
- Jensen**, R. G. (2002). "The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000." *J Dairy Sci* **85**(2): 295-350.
- Jeppesen**, J., Y. I. Chen, M. Y. Zhou, P. Schaaf, A. Coulston and G. M. Reaven (1995). "Postprandial triglyceride and retinyl ester responses to oral fat: effects of fructose." *Am J Clin Nutr* **61**(4): 787-791.
- Jimenez-Gomez**, Y., J. Lopez-Miranda, L. M. Blanco-Colio, C. Marin, P. Perez-Martinez, J. Ruano, J. A. Paniagua, F. Rodriguez, J. Egido and F. Perez-Jimenez (2009). "Olive oil and walnut breakfasts reduce the postprandial inflammatory response in mononuclear cells compared with a butter breakfast in healthy men." *Atherosclerosis* **204**(2): e70-76.
- Jong**, M. C., M. H. Hofker and L. M. Havekes (1999). "Role of ApoCs in lipoprotein metabolism: functional differences between ApoC1, ApoC2, and ApoC3." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(3): 472-484.
- Jove**, M., A. Planavila, R. M. Sanchez, M. Merlos, J. C. Laguna and M. Vazquez-Carrera (2006). "Palmitate induces tumor necrosis factor-alpha expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor-kappaB activation." *Endocrinology* **147**(1): 552-561.
- Kahn**, B. B. and J. S. Flier (2000). "Obesity and insulin resistance." *J Clin Invest* **106**(4): 473-481.
- Kalant**, D., S. Phelis, B. A. Fielding, K. N. Frayn, K. Cianflone and A. D. Sniderman (2000). "Increased postprandial fatty acid trapping in subcutaneous adipose tissue in obese women." *J Lipid Res* **41**(12): 1963-1968.
- Kamp**, F., J. A. Hamilton, F. Kamp, H. V. Westerhoff and J. A. Hamilton (1993). "Movement of fatty acids, fatty acid analogues, and bile acids across phospholipid bilayers." *Biochemistry* **32**(41): 11074-11086.
- Karleskind**, A. (1992). *Handbook of fats*.
- Karpf**, D. M., R. Holm, C. Garafalo, E. Levy, J. Jacobsen and A. Mullertz (2006). "Effect of different surfactants in biorelevant medium on the secretion of a lipophilic compound in lipoproteins using Caco-2 cell culture." *J Pharm Sci* **95**(1): 45-55.
- Kawai**, T. and T. Fushiki (2003). "Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **285**(2): R447-454.
- Kelsen**, J. R. and G. D. Wu (2012). "The gut microbiota, environment and diseases of modern society." *Gut Microbes* **3**(4).
- Keogh**, J. B., T. J. Wooster, M. Golding, L. Day, B. Otto and P. M. Clifton (2011). "Slowly and rapidly digested fat emulsions are equally satiating but their triglycerides are differentially absorbed and metabolized in humans." *J Nutr* **141**(5): 809-815.

- Kern, P. A., A. Mandic and R. H. Eckel (1987).** "Regulation of lipoprotein lipase by glucose in primary cultures of isolated human adipocytes. Relevance to hypertriglyceridemia of diabetes." *Diabetes* **36**(11): 1238-1245.
- Kern, P. A., M. Saghizadeh, J. M. Ong, R. J. Bosch, R. Deem and R. B. Simsolo (1995).** "The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase." *J Clin Invest* **95**(5): 2111-2119.
- Kershaw, E. E. and J. S. Flier (2004).** "Adipose tissue as an endocrine organ." *J Clin Endocrinol Metab* **89**(6): 2548-2556.
- Kim, F., M. Pham, I. Luttrell, D. D. Bannerman, J. Tupper, J. Thaler, T. R. Hawn, E. W. Raines and M. W. Schwartz (2007).** "Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity." *Circ Res* **100**(11): 1589-1596.
- Kinnunen, P. K. and C. Ehnolm (1976).** "Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase." *FEBS Lett* **65**(3): 354-357.
- Kinnunen, P. K., R. L. Jackson, L. C. Smith, A. M. Gotto, Jr. and J. T. Sparrow (1977).** "Activation of lipoprotein lipase by native and synthetic fragments of human plasma apolipoprotein C-II." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(11): 4848-4851.
- Kitchens, R. L., P. A. Thompson, R. S. Munford and G. E. O'Keefe (2003).** "Acute inflammation and infection maintain circulating phospholipid levels and enhance lipopolysaccharide binding to plasma lipoproteins." *J Lipid Res* **44**(12): 2339-2348.
- Korner, J., M. Bessler, L. J. Cirilo, I. M. Conwell, A. Daud, N. L. Restuccia and S. L. Wardlaw (2005).** "Effects of Roux-en-Y gastric bypass surgery on fasting and postprandial concentrations of plasma ghrelin, peptide YY, and insulin." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(1): 359-365.
- Koster, A., Y. B. Chao, M. Mosior, A. Ford, P. A. Gonzalez-DeWhitt, J. E. Hale, D. Li, Y. Qiu, C. C. Fraser, D. D. Yang, J. G. Heuer, S. R. Jaskunas and P. Eacho (2005).** "Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism." *Endocrinology* **146**(11): 4943-4950.
- Krebs, M. and M. Roden (2005).** "Molecular mechanisms of lipid-induced insulin resistance in muscle, liver and vasculature." *Diabetes Obes Metab* **7**(6): 621-632.
- Kullberg, J., M. Sundbom, A. Haenni, S. Freden, L. Johansson, P. Bornert, A. Ahlstrom, H. Ahlstrom and A. Karlsson (2011).** "Gastric bypass promotes more lipid mobilization than a similar weight loss induced by low-calorie diet." *J Obes* **2011**: 959601.
- Lack, L. (1979).** "Properties and biological significance of the ileal bile salt transport system." *Environ Health Perspect* **33**: 79-89.
- Laimer, M., C. F. Ebenbichler, S. Kaser, A. Sandhofer, H. Weiss, H. Nehoda, F. Aigner and J. R. Patsch (2002).** "Markers of chronic inflammation and obesity: a prospective study on the reversibility of this association in middle-aged women undergoing weight loss by surgical intervention." *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**(5): 659-662.
- Lairon, D. (2008).** "Lipémie postprandiale : réponse aux nutriments et conséquences physiopathologiques." *Cah. Nutr. Diét.* **43**(4).
- Lairon, D., J. Lopez-Miranda and C. Williams (2007).** "Methodology for studying postprandial lipid metabolism." *Eur J Clin Nutr* **61**(10): 1145-1161.
- Lakatos, P. L., L. S. Kiss, K. Palatka, I. Altorjay, P. Antal-Szalmas, E. Palyu, M. Udvardy, T. Molnar, K. Farkas, G. Veres, J. Harsfalvi, J. Papp and M. Papp (2011).** "Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease." *Inflamm Bowel Dis* **17**(3): 767-777.
- Lambert, J. E. and E. J. Parks (2012).** "Postprandial metabolism of meal triglyceride in humans." *Biochim Biophys Acta* **1821**(5): 721-726.

- Lamping**, N., R. Dettmer, N. W. Schroder, D. Pfeil, W. Hallatschek, R. Burger and R. R. Schumann (1998). "LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria." *J Clin Invest* **101**(10): 2065-2071.
- Larsen**, N., F. K. Vogensen, F. W. van den Berg, D. S. Nielsen, A. S. Andreasen, B. K. Pedersen, W. A. Al-Soud, S. J. Sorensen, L. H. Hansen and M. Jakobsen (2010). "Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults." *PLoS One* **5**(2): e9085.
- Lassenius**, M. I., K. H. Pietilainen, K. Kaartinen, P. J. Pussinen, J. Syrjanen, C. Forsblom, I. Porsti, A. Rissanen, J. Kaprio, J. Mustonen, P. H. Groop and M. Lehto (2011). "Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation." *Diabetes Care* **34**(8): 1809-1815.
- Laugerette**, F., J. P. Furet, C. Debarb, P. Daira, E. Loizon, A. Geloën, C. O. Soulage, C. Simonet, J. Lefils-Lacourtablaise, N. Bernoud-Hubac, J. Bodenec, N. Peretti, H. Vidal and M. C. Michalski (2012). "Oil composition of high-fat diet affects metabolic inflammation differently in connection with endotoxin receptors in mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**(3): E374-386.
- Laugerette**, F., D. Gaillard, P. Passilly-Degrace, I. Niot and P. Besnard (2007). "Do we taste fat?" *Biochimie* **89**(2): 265-269.
- Laugerette**, F., P. Passilly-Degrace, B. Patris, I. Niot, M. Febbraio, J. P. Montmayeur and P. Besnard (2005). "CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions." *J Clin Invest* **115**(11): 3177-3184.
- Laugerette**, F., C. Vors, A. Geloën, M. A. Chauvin, C. Soulage, S. Lambert-Porcheron, N. Peretti, M. Alligier, R. Burcelin, M. Laville, H. Vidal and M. C. Michalski (2011). "Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation." *J Nutr Biochem*.
- Laugerette**, F., C. Vors, N. Peretti and M. C. Michalski (2011). "Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation." *Biochimie* **93**(1): 39-45.
- Legrand**, P. (2010). Les nouveaux ANC en acides gras - Une actualisation nécessaire. C. d. R. e. d. I. Nutritionnelles. *CholéDoc* **118**.
- Lepage**, G. and C. C. Roy (1986). "Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction." *J Lipid Res* **27**(1): 114-120.
- Lepper**, P. M., M. E. Kleber, T. B. Grammer, K. Hoffmann, S. Dietz, B. R. Winkelmann, B. O. Boehm and W. Marz (2011). "Lipopolysaccharide-binding protein (LBP) is associated with total and cardiovascular mortality in individuals with or without stable coronary artery disease--results from the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study (LURIC)." *Atherosclerosis* **219**(1): 291-297.
- Lesmes**, U., P. Baudot and D. J. McClements (2010). "Impact of interfacial composition on physical stability and in vitro lipase digestibility of triacylglycerol oil droplets coated with lactoferrin and/or caseinate." *J Agric Food Chem* **58**(13): 7962-7969.
- Leung Ki**, E. L., J. Roduit, J. Delarive, J. Guyot, P. Michetti and G. Dorta (2010). "Pullulation bactérienne de l'intestin grêle." *Rev Med Suisse* **6**: 186-191.
- Levels**, J. H., P. R. Abraham, A. van den Ende and S. J. van Deventer (2001). "Distribution and kinetics of lipoprotein-bound endotoxin." *Infect Immun* **69**(5): 2821-2828.
- Levy**, E., M. Mehran and E. Seidman (1995). "Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion." *FASEB J* **9**(8): 626-635.
- Ley**, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight and J. I. Gordon (2005). "Obesity alters gut microbial ecology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 11070-11075.
- Ley**, R. E., D. A. Peterson and J. I. Gordon (2006). "Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine." *Cell* **124**(4): 837-848.
- Libby**, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." *Nature* **420**(6917): 868-874.

- Liddle**, R. A., E. T. Morita, C. K. Conrad and J. A. Williams (1986). "Regulation of gastric emptying in humans by cholecystokinin." *J Clin Invest* **77**(3): 992-996.
- Lien**, E. L., R. J. Yuhas, F. G. Boyle and R. M. Tomarelli (1993). "Corandomization of fats improves absorption in rats." *J Nutr* **123**(11): 1859-1867.
- Lievín**, V., I. Peiffer, S. Hudault, F. Rochat, D. Brassart, J. R. Neeser and A. L. Servin (2000). "Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity." *Gut* **47**(5): 646-652.
- Lin**, M. C., C. Arbeeny, K. Bergquist, B. Kienzle, D. A. Gordon and J. R. Wetterau (1994). "Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. The regulation is independent from that of other hepatic and intestinal proteins which participate in the transport of fatty acids and triglycerides." *J Biol Chem* **269**(46): 29138-29145.
- Livesey**, G. (2000). "The absorption of stearic acid from triacylglycerols: an inquiry and analysis." *Nutr Res Rev* **13**(2): 185-214.
- Lonroth**, H., J. Dalenback, E. Haglind and L. Lundell (1996). "Laparoscopic gastric bypass. Another option in bariatric surgery." *Surg Endosc* **10**(6): 636-638.
- Lopez-Garcia**, E., M. B. Schulze, J. E. Manson, J. B. Meigs, C. M. Albert, N. Rifai, W. C. Willett and F. B. Hu (2004). "Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women." *J Nutr* **134**(7): 1806-1811.
- Lopez-Miranda**, J., C. Williams and D. Lairon (2007). "Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism." *Br J Nutr* **98**(3): 458-473.
- Lorenzen**, J. K., S. Nielsen, J. J. Holst, I. Tetens, J. F. Rehfeld and A. Astrup (2007). "Effect of dairy calcium or supplementary calcium intake on postprandial fat metabolism, appetite, and subsequent energy intake." *Am J Clin Nutr* **85**(3): 678-687.
- Lorin**, A., C. Flore, A. Thomas and R. Brasseur (2004). "Les liposomes : description, fabrication et applications." *Biotechnol. Agron. Environ* **8**(3): 163-176.
- Luchoomun**, J. and M. M. Hussain (1999). "Assembly and secretion of chylomicrons by differentiated Caco-2 cells. Nascent triglycerides and preformed phospholipids are preferentially used for lipoprotein assembly." *J Biol Chem* **274**(28): 19565-19572.
- Lundman**, P., S. Boquist, A. Samnegard, M. Bennermo, C. Held, C. G. Ericsson, A. Silveira, A. Hamsten and P. Tornvall (2007). "A high-fat meal is accompanied by increased plasma interleukin-6 concentrations." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **17**(3): 195-202.
- Luzzati**, V. and F. Husson (1962). "The structure of the liquid-crystalline phasis of lipid-water systems." *J Cell Biol* **12**: 207-219.
- Macdonald**, I. A., V. D. Bokkenheuser, J. Winter, A. M. McLernon and E. H. Mosbach (1983). "Degradation of steroids in the human gut." *J Lipid Res* **24**(6): 675-700.
- Macfarlane**, G. T., J. H. Cummings and C. Allison (1986). "Protein degradation by human intestinal bacteria." *J Gen Microbiol* **132**(6): 1647-1656.
- Maillot**, F., F. Baulieu, D. Guilloteau, Y. Boirie, M. A. Garrigue, C. Hoinard and C. Couet (2008). "Gut emptying affects dietary fat contribution to postprandial lipemia following sequential meals in healthy subjects." *Nutrition* **24**(7-8): 682-688.
- Manco**, M., L. Putignani and G. F. Bottazzo (2010). "Gut microbiota, lipopolysaccharides, and innate immunity in the pathogenesis of obesity and cardiovascular risk." *Endocr Rev* **31**(6): 817-844.
- Manning**, P. J., W. H. Sutherland, G. Hendry, S. A. de Jong, M. McGrath and S. M. Williams (2004). "Changes in circulating postprandial proinflammatory cytokine concentrations in diet-controlled type 2 diabetes and the effect of ingested fat." *Diabetes Care* **27**(10): 2509-2511.

- Manning**, P. J., W. H. Sutherland, M. M. McGrath, S. A. de Jong, R. J. Walker and M. J. Williams (2008). "Postprandial cytokine concentrations and meal composition in obese and lean women." *Obesity (Silver Spring)* **16**(9): 2046-2052.
- Marcais**, C., B. Verges, S. Charriere, V. Pruneta, M. Merlin, S. Billon, L. Perrot, J. Draï, A. Sassolas, L. A. Pennacchio, J. Fruchart-Najib, J. C. Fruchart, V. Durlach and P. Moulin (2005). "Apoa5 Q139X truncation predisposes to late-onset hyperchylomicronemia due to lipoprotein lipase impairment." *J Clin Invest* **115**(10): 2862-2869.
- Marciani**, L., R. Faulks, M. S. Wickham, D. Bush, B. Pick, J. Wright, E. F. Cox, A. Fillery-Travis, P. A. Gowland and R. C. Spiller (2009). "Effect of intragastric acid stability of fat emulsions on gastric emptying, plasma lipid profile and postprandial satiety." *Br J Nutr* **101**(6): 919-928.
- Marciani**, L., M. Wickham, G. Singh, D. Bush, B. Pick, E. Cox, A. Fillery-Travis, R. Faulks, C. Marsden, P. A. Gowland and R. C. Spiller (2007). "Enhancement of intragastric acid stability of a fat emulsion meal delays gastric emptying and increases cholecystokinin release and gallbladder contraction." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**(6): G1607-1613.
- Marcos**, V., P. Latzin, A. Hector, S. Sonanini, F. Hoffmann, M. Lacher, B. Koller, P. Bufler, T. Nicolai, D. Hartl and M. Griese (2010). "Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases." *Respir Res* **11**: 32.
- Mariat**, D., O. Firmesse, F. Levenez, V. Guimaraes, H. Sokol, J. Dore, G. Corthier and J. P. Furet (2009). "The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age." *BMC Microbiol* **9**: 123.
- Marrades**, M. P., J. A. Martinez and M. J. Moreno-Aliaga (2007). "Differences in short-term metabolic responses to a lipid load in lean (resistant) vs obese (susceptible) young male subjects with habitual high-fat consumption." *Eur J Clin Nutr* **61**(2): 166-174.
- Marshall**, J. C. (2005). "Lipopolysaccharide: an endotoxin or an exogenous hormone?" *Clin Infect Dis* **41 Suppl 7**: S470-480.
- Martins**, I. J., B. C. Mortimer, J. Miller and T. G. Redgrave (1996). "Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants." *J Lipid Res* **37**(12): 2696-2705.
- Mathison**, J. C., P. S. Tobias, E. Wolfson and R. J. Ulevitch (1992). "Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS." *J Immunol* **149**(1): 200-206.
- Mathur**, S. N., E. Born, S. Murthy and F. J. Field (1996). "Phosphatidylcholine increases the secretion of triacylglycerol-rich lipoproteins by CaCo-2 cells." *Biochem J* **314 (Pt 2)**: 569-575.
- Matsushita**, H., S. Ohta, H. Shiraishi, S. Suzuki, K. Arima, S. Toda, H. Tanaka, H. Nagai, M. Kimoto, A. Inokuchi and K. Izuhara (2010). "Endotoxin tolerance attenuates airway allergic inflammation in model mice by suppression of the T-cell stimulatory effect of dendritic cells." *Int Immunol* **22**(9): 739-747.
- Mattes**, R. D. (1996). "Oral fat exposure alters postprandial lipid metabolism in humans." *Am J Clin Nutr* **63**(6): 911-917.
- Mattes**, R. D. (2002). "Oral fat exposure increases the first phase triacylglycerol concentration due to release of stored lipid in humans." *J Nutr* **132**(12): 3656-3662.
- Mattes**, R. D. (2009). "Brief oral stimulation, but especially oral fat exposure, elevates serum triglycerides in humans." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **296**(2): G365-371.
- Mattes**, R. D. (2009). "Oral Fat Exposure Pattern and Lipid Loading Effects on the Serum Triacylglycerol Concentration of Humans." *Chemosens Percept* **2**(4): 180-185.
- Mattson**, F. H. and S. M. Grundy (1985). "Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man." *J Lipid Res* **26**(2): 194-202.

- Matzinger, D.**, L. Degen, J. Drewe, J. Meuli, R. Duebendorfer, N. Ruckstuhl, M. D'Amato, L. Rovati and C. Beglinger (2000). "The role of long chain fatty acids in regulating food intake and cholecystokinin release in humans." Gut **46**(5): 688-693.
- McAllister, E. J.**, N. V. Dhurandhar, S. W. Keith, L. J. Aronne, J. Barger, M. Baskin, R. M. Benca, J. Biggio, M. M. Boggiano, J. C. Eisenmann, M. Elobeid, K. R. Fontaine, P. Gluckman, E. C. Hanlon, P. Katzmarzyk, A. Pietrobelli, D. T. Redden, D. M. Ruden, C. Wang, R. A. Waterland, S. M. Wright and D. B. Allison (2009). "Ten putative contributors to the obesity epidemic." Crit Rev Food Sci Nutr **49**(10): 868-913.
- McClements, D. J.** and H. Xiao (2012). "Potential biological fate of ingested nanoemulsions: influence of particle characteristics." Food Funct **3**(3): 202-220.
- McNeil, N. I.** (1984). "The contribution of the large intestine to energy supplies in man." Am J Clin Nutr **39**(2): 338-342.
- Mekki, N.**, M. Charbonnier, P. Borel, J. Leonardi, C. Juhel, H. Portugal and D. Lairon (2002). "Butter differs from olive oil and sunflower oil in its effects on postprandial lipemia and triacylglycerol-rich lipoproteins after single mixed meals in healthy young men." J Nutr **132**(12): 3642-3649.
- Mekki, N.**, M. A. Christofilis, M. Charbonnier, C. Atlan-Gepner, C. Defoort, C. Juhel, P. Borel, H. Portugal, A. M. Pauli, B. Vialettes and D. Lairon (1999). "Influence of obesity and body fat distribution on postprandial lipemia and triglyceride-rich lipoproteins in adult women." J Clin Endocrinol Metab **84**(1): 184-191.
- Merkel, M.**, B. Loeffler, M. Kluger, N. Fabig, G. Geppert, L. A. Pennacchio, A. Laatsch and J. Heeren (2005). "Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase." J Biol Chem **280**(22): 21553-21560.
- Meydani, S. N.** and C. A. Dinarello (1993). "Influence of dietary fatty acids on cytokine production and its clinical implications." Nutr Clin Pract **8**(2): 65-72.
- Michalski, M. C.**, V. Briard, M. Desage and A. Geloën (2005). "The dispersion state of milk fat influences triglyceride metabolism in the rat--a ^{13}C breath test study." Eur J Nutr **44**(7): 436-444.
- Michalski, M. C.** and C. Januel (2006). "Does homogenization affect the human health properties of cow's milk?" Trends in Food Science & Technology **17**(8): 432-437.
- Michalski, M. C.**, F. Michel and C. Geneste (2002). "Appearance of submicronic particles in the milk fat globule size distribution upon mechanical treatments." Lait **82**(2): 193-208.
- Michalski, M. C.**, A. F. Soares, C. Lopez, N. Leconte, V. Briard and A. Geloën (2006). "The supramolecular structure of milk fat influences plasma triacylglycerols and fatty acid profile in the rat." Eur J Nutr **45**(4): 215-224.
- Miles, J. M.** and R. H. Nelson (2007). "Contribution of triglyceride-rich lipoproteins to plasma free fatty acids." Horm Metab Res **39**(10): 726-729.
- Miles, J. M.**, Y. S. Park, D. Walewicz, C. Russell-Lopez, S. Windsor, W. L. Isley, S. W. Coppack and W. S. Harris (2004). "Systemic and forearm triglyceride metabolism: fate of lipoprotein lipase-generated glycerol and free fatty acids." Diabetes **53**(3): 521-527.
- Miller, W. C.** (1999). "How effective are traditional dietary and exercise interventions for weight loss?" Med Sci Sports Exerc **31**(8): 1129-1134.
- Milton, D. K.**, D. K. Johnson and J. H. Park (1997). "Environmental endotoxin measurement: interference and sources of variation in the Limulus assay of house dust." Am Ind Hyg Assoc J **58**(12): 861-867.
- Mohamed-Ali, V.**, S. Goodrick, A. Rawesh, D. R. Katz, J. M. Miles, J. S. Yudkin, S. Klein and S. W. Coppack (1997). "Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo." J Clin Endocrinol Metab **82**(12): 4196-4200.

- Monte, S. V., J. A. Caruana, H. Ghanim, C. L. Sia, K. Korzeniewski, J. J. Schentag and P. Dandona** (2012). "Reduction in endotoxemia, oxidative and inflammatory stress, and insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery in patients with morbid obesity and type 2 diabetes mellitus." Surgery **151**(4): 587-593.
- Moreau, H., R. Laugier, Y. Gargouri, F. Ferrato and R. Verger** (1988). "Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin." Gastroenterology **95**(5): 1221-1226.
- Moreno-Navarrete, J. M., F. Ortega, M. Serino, E. Luche, A. Waget, G. Pardo, J. Salvador, W. Ricart, G. Fruhbeck, R. Burcelin and J. M. Fernandez-Real** (2011). "Circulating lipopolysaccharide-binding protein (LBP) as a marker of obesity-related insulin resistance." Int J Obes (Lond).
- Mortensen, L. S., M. L. Hartvigsen, L. J. Brader, A. Astrup, J. Schrezenmeir, J. J. Holst, C. Thomsen and K. Hermansen** (2009). "Differential effects of protein quality on postprandial lipemia in response to a fat-rich meal in type 2 diabetes: comparison of whey, casein, gluten, and cod protein." Am J Clin Nutr **90**(1): 41-48.
- Mortimer, B. C., D. J. Holthouse, I. J. Martins, R. V. Stick and T. G. Redgrave** (1994). "Effects of triacylglycerol-saturated acyl chains on the clearance of chylomicron-like emulsions from the plasma of the rat." Biochim Biophys Acta **1211**(2): 171-180.
- Mu, H. and C. E. Hoy** (2004). "The digestion of dietary triacylglycerols." Prog Lipid Res **43**(2): 105-133.
- Mun, S., A. Decker and D. J. McClements** (2007). "Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase." Food Research International **40**: 770-781.
- Murphy, J. L., A. Jones, S. Brookes and S. A. Wootton** (1995). "The gastrointestinal handling and metabolism of [1-13C]palmitic acid in healthy women." Lipids **30**(4): 291-298.
- Murphy, M. C., S. G. Isherwood, S. Sethi, B. J. Gould, J. W. Wright, J. A. Knapper and C. M. Williams** (1995). "Postprandial lipid and hormone responses to meals of varying fat contents: modulatory role of lipoprotein lipase?" Eur J Clin Nutr **49**(8): 578-588.
- Murri, M., E. Garcia-Fuentes, J. M. Garcia-Almeida, L. Garrido-Sanchez, M. D. Mayas, R. Bernal and F. J. Tinahones** (2010). "Changes in oxidative stress and insulin resistance in morbidly obese patients after bariatric surgery." Obes Surg **20**(3): 363-368.
- N'Goma, J. C., S. Amara, K. Dridi, V. Jannin and F. Carriere** (2012). "Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems." Ther Deliv **3**(1): 105-124.
- Nabeno-Kaeriyama, Y., Y. Fukuchi, S. Hayashi, T. Kimura, A. Tanaka and M. Naito** (2010). "Delayed postprandial metabolism of triglyceride-rich lipoproteins in obese young men compared to lean young men." Clin Chim Acta **411**(21-22): 1694-1699.
- Nappo, F., K. Esposito, M. Cioffi, G. Giugliano, A. M. Molinari, G. Paolisso, R. Marfella and D. Giugliano** (2002). "Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals." J Am Coll Cardiol **39**(7): 1145-1150.
- Neal, M. D., C. Leaphart, R. Levy, J. Prince, T. R. Billiar, S. Watkins, J. Li, S. Cetin, H. Ford, A. Schreiber and D. J. Hackam** (2006). "Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier." J Immunol **176**(5): 3070-3079.
- Nelson, R. H., R. Basu, C. M. Johnson, R. A. Rizza and J. M. Miles** (2007). "Splanchnic spillover of extracellular lipase-generated fatty acids in overweight and obese humans." Diabetes **56**(12): 2878-2884.
- Neyraud, E., O. Palicki, C. Schwartz, S. Nicklaus and G. Feron** (2012). "Variability of human saliva composition: possible relationships with fat perception and liking." Arch Oral Biol **57**(5): 556-566.

- Nordestgaard**, B. G., M. Benn, P. Schnohr and A. Tybjaerg-Hansen (2007). "Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women." *JAMA* **298**(3): 299-308.
- Normand**, S., Y. Khalfallah, C. Louche-Pelissier, C. Pachiardi, J. M. Antoine, S. Blanc, M. Desage, J. P. Riou and M. Laville (2001). "Influence of dietary fat on postprandial glucose metabolism (exogenous and endogenous) using intrinsically (13)C-enriched durum wheat." *Br J Nutr* **86**(1): 3-11.
- Olivecrona**, T., M. Bergh, M. Hultin and G. Olivecrona (1995). "Nutritional regulation of lipoprotein lipase." *Can J Cardiol* **11 Suppl G**: 73G-78G.
- Ollivon**, M. and R. Perron (1992). Propriétés physiques des corps gras. Propriétés générales de la chaîne hydrocarbonée. A. Karleskind, Manuel des corps gras. P. T. D. Lavoisier.
- Ory**, D. S. (2007). "Chylomicrons and lipoprotein lipase at the endothelial surface: bound and GAG-ged?" *Cell Metab* **5**(4): 229-231.
- Ouellette**, A. J. (1997). "Paneth cells and innate immunity in the crypt microenvironment." *Gastroenterology* **113**(5): 1779-1784.
- Pafumi**, Y., D. Lairon, P. L. de la Porte, C. Juhel, J. Storch, M. Hamosh and M. Armand (2002). "Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase." *J Biol Chem* **277**(31): 28070-28079.
- Palmer**, C., E. M. Bik, D. B. DiGiulio, D. A. Relman and P. O. Brown (2007). "Development of the human infant intestinal microbiota." *PLoS Biol* **5**(7): e177.
- Panagiotakos**, D. B., C. H. Pitsavos, A. D. Zampelas, C. A. Chrysohoou and C. I. Stefanadis (2010). "Dairy products consumption is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease in apparently healthy adults: the ATTICA study." *J Am Coll Nutr* **29**(4): 357-364.
- Pastor Rojo**, O., A. Lopez San Roman, E. Albeniz Arbizu, A. de la Hera Martinez, E. Ripoll Sevillano and A. Albillos Martinez (2007). "Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis* **13**(3): 269-277.
- Pauquai**, T., J. Bouchoux, D. Chateau, R. Vidal, M. Rousset, J. Chambaz and S. Demignot (2006). "Adaptation of enterocytic Caco-2 cells to glucose modulates triacylglycerol-rich lipoprotein secretion through triacylglycerol targeting into the endoplasmic reticulum lumen." *Biochem J* **395**(2): 393-403.
- Pendyala**, S., J. M. Walker and P. R. Holt (2012). "A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut." *Gastroenterology* **142**(5): 1100-1101 e1102.
- Petit**, V., I. Niot, H. Poirier and P. Besnard (2007). "Fatty acids intestinal absorption: facts and uncertainties." *Nutrition clinique et métabolique* **21**: 38-45.
- Pharmacopée Européenne** (2001). Endotoxines bactériennes. **addendum texte n° 2614**.
- Phillips**, M. L., C. Pullinger, I. Kroes, J. Kroes, D. A. Hardman, G. Chen, L. K. Curtiss, M. M. Gutierrez, J. P. Kane and V. N. Schumaker (1997). "A single copy of apolipoprotein B-48 is present on the human chylomicron remnant." *J Lipid Res* **38**(6): 1170-1177.
- Piers**, L. S., K. Z. Walker, R. M. Stoney, M. J. Soares and K. O'Dea (2002). "The influence of the type of dietary fat on postprandial fat oxidation rates: monounsaturated (olive oil) vs saturated fat (cream)." *Int J Obes Relat Metab Disord* **26**(6): 814-821.
- Pischon**, T., S. E. Hankinson, G. S. Hotamisligil, N. Rifai, W. C. Willett and E. B. Rimm (2003). "Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women." *Circulation* **108**(2): 155-160.
- Poitout**, V. and R. P. Robertson (2008). "Glucolipototoxicity: fuel excess and beta-cell dysfunction." *Endocr Rev* **29**(3): 351-366.

- Poppitt, S. D., G. F. Keogh, F. E. Lithander, Y. Wang, T. B. Mulvey, Y. K. Chan, B. H. McArdle and G. J. Cooper (2008).** "Postprandial response of adiponectin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and C-reactive protein to a high-fat dietary load." *Nutrition* **24**(4): 322-329.
- Porsgaard, T. and C. E. Hoy (2000).** "Lymphatic transport in rats of several dietary fats differing in fatty acid profile and triacylglycerol structure." *J Nutr* **130**(6): 1619-1624.
- Rallidis, L. S., G. Paschos, G. K. Liakos, A. H. Velissaridou, G. Anastasiadis and A. Zampelas (2003).** "Dietary alpha-linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidaemic patients." *Atherosclerosis* **167**(2): 237-242.
- Ran-Ressler, R. R., D. Sim, A. M. O'Donnell-Megaró, D. E. Bauman, D. M. Barbano and J. T. Brenna (2011).** "Branched chain fatty acid content of United States retail cow's milk and implications for dietary intake." *Lipids* **46**(7): 569-576.
- Ranheim, T., A. Gedde-Dahl, A. C. Rustan and C. A. Drevon (1994).** "Fatty acid uptake and metabolism in CaCo-2 cells: eicosapentaenoic acid (20:5(n-3)) and oleic acid (18:1(n-9)) presented in association with micelles or albumin." *Biochim Biophys Acta* **1212**(3): 295-304.
- Raynal-Ljutovac, K., J. Bouvier, C. Gayet, N. Simon, F. Joffre, F. Fine, J. L. Vendevre, C. Lopez, J. M. Chardigny, M. C. Michalski and C. Genot (2011).** "Organisation structurale et moléculaire des lipides dans les aliments : impacts possibles sur leur digestion et leur assimilation par l'Homme." *Oléagineux Corps gras Lipides* **18**(6): 324-351.
- Raz, I., R. Eldor, S. Cernea and E. Shafir (2005).** "Diabetes: insulin resistance and derangements in lipid metabolism. Cure through intervention in fat transport and storage." *Diabetes Metab Res Rev* **21**(1): 3-14.
- Redgrave, T. G., D. R. Kodali and D. M. Small (1988).** "The effect of triacyl-sn-glycerol structure on the metabolism of chylomicrons and triacylglycerol-rich emulsions in the rat." *J Biol Chem* **263**(11): 5118-5123.
- Rein, P., C. H. Saely, S. Aczel, B. Patsch and H. Drexel (2009).** "Omega-3 fatty acids significantly reduce postprandial triglyceridemia in male smokers: a pilot study." *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **19**(2): e3-4.
- Renaud, S. C., J. C. Ruf and D. Petithory (1995).** "The positional distribution of fatty acids in palm oil and lard influences their biologic effects in rats." *J Nutr* **125**(2): 229-237.
- Ridlon, J. M., D. J. Kang and P. B. Hylemon (2006).** "Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria." *J Lipid Res* **47**(2): 241-259.
- Rietschel, E. T., T. Kirikae, F. U. Schade, U. Mamat, G. Schmidt, H. Loppnow, A. J. Ulmer, U. Zahringer, U. Seydel, F. Di Padova and et al. (1994).** "Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function." *FASEB J* **8**(2): 217-225.
- Rigaud, D. and J. C. Melchior (1992).** *Le métabolisme énergétique chez l'homme - Méthodes de mesure et applications pratiques.*
- Robertson, M. D., M. Parkes, B. F. Warren, D. J. Ferguson, K. G. Jackson, D. P. Jewell and K. N. Frayn (2003).** "Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans." *Gut* **52**(6): 834-839.
- Roche, H. M., A. Zampelas, J. M. Knapper, D. Webb, C. Brooks, K. G. Jackson, J. W. Wright, B. J. Gould, A. Kafatos, M. J. Gibney and C. M. Williams (1998).** "Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism." *Am J Clin Nutr* **68**(3): 552-560.
- Ruge, T., L. Hodson, J. Cheeseman, A. L. Dennis, B. A. Fielding, S. M. Humphreys, K. N. Frayn and F. Karpe (2009).** "Fasted to fed trafficking of Fatty acids in human adipose tissue reveals a novel regulatory step for enhanced fat storage." *J Clin Endocrinol Metab* **94**(5): 1781-1788.
- Sadur, C. N. and R. H. Eckel (1982).** "Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique." *J Clin Invest* **69**(5): 1119-1125.

- Saffari, B., J. M. Ong and P. A. Kern (1992).** "Regulation of adipose tissue lipoprotein lipase gene expression by thyroid hormone in rats." J Lipid Res **33**(2): 241-249.
- Salvini, S., M. Charbonnier, C. Defoort, C. Alquier and D. Lairon (2002).** "Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing." Br J Nutr **87**(3): 211-217.
- Sanders, T. A. (2003).** "Dietary fat and postprandial lipids." Curr Atheroscler Rep **5**(6): 445-451.
- Sanders, T. A., A. Filippou, S. E. Berry, S. Baumgartner and R. P. Mensink (2011).** "Palmitic acid in the sn-2 position of triacylglycerols acutely influences postprandial lipid metabolism." Am J Clin Nutr **94**(6): 1433-1441.
- Sanders, T. A., F. R. Oakley, J. A. Cooper and G. J. Miller (2001).** "Influence of a stearic acid-rich structured triacylglycerol on postprandial lipemia, factor VII concentrations, and fibrinolytic activity in healthy subjects." Am J Clin Nutr **73**(4): 715-721.
- Savage, D. C. (1977).** "Microbial ecology of the gastrointestinal tract." Annu Rev Microbiol **31**: 107-133.
- Schaeffler, A., P. Gross, R. Buettner, C. Bollheimer, C. Buechler, M. Neumeier, A. Kopp, J. Schoelmerich and W. Falk (2009).** "Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity." Immunology **126**(2): 233-245.
- Schaffer, J. E. and H. F. Lodish (1994).** "Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein." Cell **79**(3): 427-436.
- Schauer, P. R., S. R. Kashyap, K. Wolski, S. A. Brethauer, J. P. Kirwan, C. E. Pothier, S. Thomas, B. Abood, S. E. Nissen and D. L. Bhatt (2012).** "Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes." N Engl J Med **366**(17): 1567-1576.
- Schreiner, M., H. W. Hulan, E. Razzazi-Fazeli, J. Bohm and C. Iben (2004).** "Feeding laying hens seal blubber oil: effects on egg yolk incorporation, stereospecific distribution of omega-3 fatty acids, and sensory aspects." Poult Sci **83**(3): 462-473.
- Schutz, Y., J. P. Flatt and E. Jequier (1989).** "Failure of dietary fat intake to promote fat oxidation: a factor favoring the development of obesity." Am J Clin Nutr **50**(2): 307-314.
- Serino, M., E. Luche, S. Gres, A. Baylac, M. Berge, C. Cenac, A. Waget, P. Klopp, J. Iacovoni, C. Klopp, J. Mariette, O. Bouchez, J. Lluch, F. Ouarne, P. Monsan, P. Valet, C. Roques, J. Amar, A. Bouloumie, V. Theodorou and R. Burcelin (2012).** "Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota." Gut **61**(4): 543-553.
- Shachter, N. S. (2001).** "Apolipoproteins C-I and C-III as important modulators of lipoprotein metabolism." Curr Opin Lipidol **12**(3): 297-304.
- Shi, X., S. Karmali, A. M. Sharma and D. W. Birch (2010).** "A review of laparoscopic sleeve gastrectomy for morbid obesity." Obes Surg **20**(8): 1171-1177.
- Shiau, Y. F., P. Fernandez, M. J. Jackson and S. McMonagle (1985).** "Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine." Am J Physiol **248**(6 Pt 1): G608-617.
- Shimizugawa, T., M. Ono, M. Shimamura, K. Yoshida, Y. Ando, R. Koishi, K. Ueda, T. Inaba, H. Minekura, T. Kohama and H. Furukawa (2002).** "ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase." J Biol Chem **277**(37): 33742-33748.
- Simon, G. L. and S. L. Gorbach (1984).** "Intestinal flora in health and disease." Gastroenterology **86**(1): 174-193.
- Simopoulos, A. P. (2002).** "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids." Biomed Pharmacother **56**(8): 365-379.

- Singh, H.** and A. Sarkar (2011). "Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions." Advances in Colloid and Interface Science **165**: 47-57.
- Singh, H., A. Ye** and D. Horne (2009). "Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion." Prog Lipid Res **48**(2): 92-100.
- Small, D. M.** (1991). "The effects of glyceride structure on absorption and metabolism." Annu Rev Nutr **11**: 413-434.
- Smith, E. A.** and G. T. Macfarlane (1997). "Dissimilatory amino Acid metabolism in human colonic bacteria." Anaerobe **3**(5): 327-337.
- Soares, M. J., S. J. Cummings, J. C. Mamo, M. Kenrick** and L. S. Piers (2004). "The acute effects of olive oil v. cream on postprandial thermogenesis and substrate oxidation in postmenopausal women." Br J Nutr **91**(2): 245-252.
- Softly, B., A. S. Huang, J. W. Finley, M. Petersheim, R. G. Yarger, M. M. Chrysam, R. L. Wieczorek, M. S. Otterburn, A. Manz** and G. J. Templeman (1994). "Composition of representative SALATRIM fat preparations : A potential low-calorie fat substitute." Journal of agricultural and food chemistry **42**(2): 461-467.
- Sokol, H., P. Seksik, J. P. Furet, O. Firmesse, I. Nion-Larmurier, L. Beaugerie, J. Cosnes, G. Corthier, P. Marteau** and J. Dore (2009). "Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota." Inflamm Bowel Dis **15**(8): 1183-1189.
- Sokol, H., P. Seksik, L. Rigottier-Gois, C. Lay, P. Lepage, I. Podglajen, P. Marteau** and J. Dore (2006). "Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **12**(2): 106-111.
- Sonko, B. J., A. M. Prentice, W. A. Coward, P. R. Murgatroyd** and G. R. Goldberg (2001). "Dose-response relationship between fat ingestion and oxidation: quantitative estimation using whole-body calorimetry and ¹³C isotope ratio mass spectrometry." Eur J Clin Nutr **55**(1): 10-18.
- Stoll, L. L., G. M. Denning, W. G. Li, J. B. Rice, A. L. Harrelson, S. A. Romig, S. T. Gunnlaugsson, F. J. Miller, Jr.** and N. L. Weintraub (2004). "Regulation of endotoxin-induced proinflammatory activation in human coronary artery cells: expression of functional membrane-bound CD14 by human coronary artery smooth muscle cells." J Immunol **173**(2): 1336-1343.
- Stremmel, W.** (1988). "Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein." J Clin Invest **82**(6): 2001-2010.
- Stremmel, W., G. Lotz, G. Strohmeyer** and P. D. Berk (1985). "Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes." J Clin Invest **75**(3): 1068-1076.
- Sun, L., Z. Yu, X. Ye, S. Zou, H. Li, D. Yu, H. Wu, Y. Chen, J. Dore, K. Clement, F. B. Hu** and X. Lin (2010). "A marker of endotoxemia is associated with obesity and related metabolic disorders in apparently healthy Chinese." Diabetes Care **33**(9): 1925-1932.
- Sussman, M.** (2002). San Diego, CA: Academic.
- Svensson, J., A. Rosenquist** and L. Ohlsson (2011). "Postprandial lipid responses to an alpha-linolenic acid-rich oil, olive oil and butter in women: a randomized crossover trial." Lipids Health Dis **10**: 106.
- Tanaka, T., K. Hosaka, M. Hoshimaru** and S. Numa (1979). "Purification and properties of long-chain acyl-coenzyme-A synthetase from rat liver." Eur J Biochem **98**(1): 165-172.
- Tap, J., S. Mondot, F. Levenez, E. Pelletier, C. Caron, J. P. Furet, E. Ugarte, R. Munoz-Tamayo, D. L. Paslier, R. Nalin, J. Dore** and M. Leclerc (2009). "Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core." Environ Microbiol **11**(10): 2574-2584.

- Teng, K. T., G. Nagapan, H. M. Cheng and K. Nesaretnam (2011).** "Palm olein and olive oil cause a higher increase in postprandial lipemia compared with lard but had no effect on plasma glucose, insulin and adipocytokines." *Lipids* **46**(4): 381-388.
- Tholstrup, T., K. T. Teng and M. Raff (2011).** "Dietary cocoa butter or refined olive oil does not alter postprandial hsCRP and IL-6 concentrations in healthy women." *Lipids* **46**(4): 365-370.
- Thomas, C. D., J. C. Peters, G. W. Reed, N. N. Abumrad, M. Sun and J. O. Hill (1992).** "Nutrient balance and energy expenditure during ad libitum feeding of high-fat and high-carbohydrate diets in humans." *Am J Clin Nutr* **55**(5): 934-942.
- Thomsen, C., O. Rasmussen, T. Lousen, J. J. Holst, S. Fenselau, J. Schrezenmeir and K. Hermansen (1999).** "Differential effects of saturated and monounsaturated fatty acids on postprandial lipemia and incretin responses in healthy subjects." *Am J Clin Nutr* **69**(6): 1135-1143.
- Thomson, A. B., M. Keelan, M. L. Garg and M. T. Clandinin (1989).** "Intestinal aspects of lipid absorption: in review." *Can J Physiol Pharmacol* **67**(3): 179-191.
- Tobias, P. S., J. Mathison, D. Mintz, J. D. Lee, V. Kravchenko, K. Kato, J. Pugin and R. J. Ulevitch (1992).** "Participation of lipopolysaccharide-binding protein in lipopolysaccharide-dependent macrophage activation." *Am J Respir Cell Mol Biol* **7**(3): 239-245.
- Tobias, P. S., K. Soldau and R. J. Ulevitch (1989).** "Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein." *J Biol Chem* **264**(18): 10867-10871.
- Tomlinson, J. E. and A. T. Blikslager (2004).** "Interactions between lipopolysaccharide and the intestinal epithelium." *J Am Vet Med Assoc* **224**(9): 1446-1452.
- Toth, C. A. and P. Thomas (1992).** "Liver endocytosis and Kupffer cells." *Hepatology* **16**(1): 255-266.
- Traber, M. G., H. J. Kayden and M. J. Rindler (1987).** "Polarized secretion of newly synthesized lipoproteins by the Caco-2 human intestinal cell line." *J Lipid Res* **28**(11): 1350-1363.
- Trigatti, B. L., D. Mangroo and G. E. Gerber (1991).** "Photoaffinity labeling and fatty acid permeation in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* **266**(33): 22621-22625.
- Tripathy, D., P. Mohanty, S. Dhindsa, T. Syed, H. Ghanim, A. Aljada and P. Dandona (2003).** "Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects." *Diabetes* **52**(12): 2882-2887.
- Troy, S., M. Soty, L. Ribeiro, L. Laval, S. Migrenne, X. Fioramonti, B. Pillot, V. Fauveau, R. Aubert, B. Viollet, M. Foretz, J. Leclerc, A. Duchampt, C. Zitoun, B. Thorens, C. Magnan, G. Mithieux and F. Andreelli (2008).** "Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice." *Cell Metab* **8**(3): 201-211.
- Tsetsonis, N. V. and A. E. Hardman (1996).** "Effects of low and moderate intensity treadmill walking on postprandial lipaemia in healthy young adults." *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **73**(5): 419-426.
- Tsuzuki, W. (2007).** "Absorption properties of micellar lipid metabolites into Caco2 cells." *Lipids* **42**(7): 613-619.
- Tulk, H. M. and L. E. Robinson (2009).** "Modifying the n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratio of a high-saturated fat challenge does not acutely attenuate postprandial changes in inflammatory markers in men with metabolic syndrome." *Metabolism* **58**(12): 1709-1716.
- Unger, R. H. (1995).** "Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications." *Diabetes* **44**(8): 863-870.
- Unger, R. H. and L. Orci (2000).** "Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity." *Int J Obes Relat Metab Disord* **24** Suppl 4: S28-32.
- Vague, J. (1956).** "The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease." *Am J Clin Nutr* **4**(1): 20-34.

- van Dielen**, F. M., C. van't Veer, A. M. Schols, P. B. Soeters, W. A. Buurman and J. W. Greve (2001). "Increased leptin concentrations correlate with increased concentrations of inflammatory markers in morbidly obese individuals." *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**(12): 1759-1766.
- van Greevenbroek**, M. M., D. W. Erkelens and T. W. de Bruin (2000). "Caco-2 cells secrete two independent classes of lipoproteins with distinct density: effect of the ratio of unsaturated to saturated fatty acid." *Atherosclerosis* **149**(1): 25-31.
- van Greevenbroek**, M. M., G. van Meer, D. W. Erkelens and T. W. de Bruin (1996). "Effects of saturated, mono-, and polyunsaturated fatty acids on the secretion of apo B containing lipoproteins by Caco-2 cells." *Atherosclerosis* **121**(1): 139-150.
- Verger**, R. (1980). "Enzyme kinetics of lipolysis." *Methods Enzymol* **64**: 340-392.
- Vidal**, R., S. Hernandez-Vallejo, T. Pauquai, O. Texier, M. Rousset, J. Chambaz, S. Demignot and J. M. Lacorte (2005). "Apple procyanidins decrease cholesterol esterification and lipoprotein secretion in Caco-2/TC7 enterocytes." *J Lipid Res* **46**(2): 258-268.
- Visser**, M., L. M. Bouter, G. M. McQuillan, M. H. Wener and T. B. Harris (1999). "Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults." *JAMA* **282**(22): 2131-2135.
- Vors**, C., P. Capolino, C. Guerin, E. Meugnier, S. Pesenti, M. A. Chauvin, J. Monteil, N. Peretti, M. Cansell, F. Carriere and M. C. Michalski (2012). "Coupling in vitro gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions." *Food Funct* **3**(5): 537-546.
- Vozarova**, B., C. Weyer, K. Hanson, P. A. Tataranni, C. Bogardus and R. E. Pratley (2001). "Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion." *Obes Res* **9**(7): 414-417.
- Vreugdenhil**, A. C., C. H. Rousseau, T. Hartung, J. W. Greve, C. van 't Veer and W. A. Buurman (2003). "Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons." *J Immunol* **170**(3): 1399-1405.
- Wang**, C. S., W. J. McConathy, H. U. Kloer and P. Alaupovic (1985). "Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III." *J Clin Invest* **75**(2): 384-390.
- Wang**, H. and R. H. Eckel (2009). "Lipoprotein lipase: from gene to obesity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**(2): E271-288.
- Wang**, Y. and M. A. Beydoun (2007). "The obesity epidemic in the United States--gender, age, socioeconomic, racial/ethnic, and geographic characteristics: a systematic review and meta-regression analysis." *Epidemiol Rev* **29**: 6-28.
- Wang**, Y., E. B. Rimm, M. J. Stampfer, W. C. Willett and F. B. Hu (2005). "Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men." *Am J Clin Nutr* **81**(3): 555-563.
- Weigert**, C., K. Brodbeck, H. Staiger, C. Kausch, F. Machicao, H. U. Haring and E. D. Schleicher (2004). "Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB." *J Biol Chem* **279**(23): 23942-23952.
- Weisberg**, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante, Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* **112**(12): 1796-1808.
- Westphal**, S., S. Kastner, E. Taneva, A. Leodolter, J. Dierkes and C. Luley (2004). "Postprandial lipid and carbohydrate responses after the ingestion of a casein-enriched mixed meal." *Am J Clin Nutr* **80**(2): 284-290.
- Westphal**, S., M. Orth, A. Ambrosch, K. Osmundsen and C. Luley (2000). "Postprandial chylomicrons and VLDLs in severe hypertriglyceridemia are lowered more effectively than are chylomicron remnants after treatment with n-3 fatty acids." *Am J Clin Nutr* **71**(4): 914-920.

- Wickham, M., M. Garrood, J. Leney, P. D. Wilson and A. Fillery-Travis (1998).** "Modification of a phospholipid stabilized emulsion interface by bile salt: effect on pancreatic lipase activity." *J Lipid Res* **39**(3): 623-632.
- Wilde, P. J. and B. S. Chu (2011).** "Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion." *Adv Colloid Interface Sci* **165**(1): 14-22.
- Williams, C. M., F. Moore, L. Morgan and J. Wright (1992).** "Effects of n-3 fatty acids on postprandial triacylglycerol and hormone concentrations in normal subjects." *Br J Nutr* **68**(3): 655-666.
- Wisén, O. and C. Johansson (1992).** "Gastrointestinal function in obesity: motility, secretion, and absorption following a liquid test meal." *Metabolism* **41**(4): 390-395.
- Woelnerhanssen, B., R. Peterli, R. E. Steinert, T. Peters, Y. Borbely and C. Beglinger (2011).** "Effects of postbariatric surgery weight loss on adipokines and metabolic parameters: comparison of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy--a prospective randomized trial." *Surg Obes Relat Dis* **7**(5): 561-568.
- Wostmann, B. S. (1973).** "Intestinal bile acids and cholesterol absorption in the germfree rat." *J Nutr* **103**(7): 982-990.
- Wurfel, M. M., S. T. Kunitake, H. Lichenstein, J. P. Kane and S. D. Wright (1994).** "Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS." *J Exp Med* **180**(3): 1025-1035.
- Xiang, S. Q., K. Cianflone, D. Kalant and A. D. Sniderman (1999).** "Differential binding of triglyceride-rich lipoproteins to lipoprotein lipase." *J Lipid Res* **40**(9): 1655-1663.
- Xu, H., G. T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C. J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L. A. Tartaglia and H. Chen (2003).** "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." *J Clin Invest* **112**(12): 1821-1830.
- Yli-Jokipii, K. M., U. S. Schwab, R. L. Tahvonen, J. P. Kurvinen, H. M. Mykkanen and H. P. Kallio (2003).** "Chylomicron and VLDL TAG structures and postprandial lipid response induced by lard and modified lard." *Lipids* **38**(7): 693-703.
- Yost, T. J., D. R. Jensen, B. R. Haugen and R. H. Eckel (1998).** "Effect of dietary macronutrient composition on tissue-specific lipoprotein lipase activity and insulin action in normal-weight subjects." *Am J Clin Nutr* **68**(2): 296-302.
- Young, S. G., B. S. Davies, L. G. Fong, P. Gin, M. M. Weinstein, A. Bensadoun and A. P. Beigneux (2007).** "GPIHBP1: an endothelial cell molecule important for the lipolytic processing of chylomicrons." *Curr Opin Lipidol* **18**(4): 389-396.
- Youssef-Elabd, E. M., K. C. McGee, G. Tripathi, N. Aldaghri, M. S. Abdalla, H. M. Sharada, E. Ashour, A. I. Amin, A. Ceriello, J. P. O'Hare, S. Kumar, P. G. McTernan and A. L. Harte (2012).** "Acute and chronic saturated fatty acid treatment as a key instigator of the TLR-mediated inflammatory response in human adipose tissue, in vitro." *J Nutr Biochem* **23**(1): 39-50.
- Zampelas, A., A. S. Peel, B. J. Gould, J. Wright and C. M. Williams (1994).** "Polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 series: effects on postprandial lipid and apolipoprotein levels in healthy men." *Eur J Clin Nutr* **48**(12): 842-848.
- Zemel, M. B. and X. Sun (2008).** "Dietary calcium and dairy products modulate oxidative and inflammatory stress in mice and humans." *J Nutr* **138**(6): 1047-1052.
- Zhang, H., J. K. DiBaise, A. Zuccolo, D. Kudrna, M. Braidotti, Y. Yu, P. Parameswaran, M. D. Crowell, R. Wing, B. E. Rittmann and R. Krajmalnik-Brown (2009).** "Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(7): 2365-2370.
- Zweigner, J., H. J. Gramm, O. C. Singer, K. Wegscheider and R. R. Schumann (2001).** "High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes." *Blood* **98**(13): 3800-3808.

ANNEXES

Liste des aliments interdits pendant la semaine précédant les journées d'exploration métaboliques et durant les 3 jours suivants

- Maïs sous toutes ses formes :
 - corn flakes et toutes les céréales au maïs (Frosties...)
 - pop corn
 - huile de maïs
 - polenta
 - snacks apéritifs à base de farine de maïs

- Sucre de canne

- Fruits exotiques :
 - mangue
 - ananas
 - papaye
 - kiwis

- Fruits au sirop

- Crèmes dessert

- Crèmes glacées (les sorbets ne sont pas à exclure)

- Chicorée, salsifis, artichauts, légumes secs plus d'une fois par semaine

- Produits laitiers fermentés au bifidus, yaourts aux fruits 0%, confiseries « light », lait enrichi en fibres, biscuits « light », rhubarbe, prune, pruneaux

Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011, 25, 2697–2703
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.5067

¹³C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1-¹³C3]tripalmitin and [1,1,1-¹³C3]triolein[†]

Laure Gabert^{1,4}, Cécile Vors^{1,2}, Corinne Louche-Pélissier^{1,4}, Valérie Sauvinet^{1,2},
Stéphanie Lambert-Porcheron^{1,4}, Jocelyne Drai^{1,4}, Martine Laville^{1,2,4}, Michel Désage^{1*}
and Marie-Caroline Michalski^{1,2,3}

¹Lyon University, CRNH-RA and Center for European Nutrition, Safety and Health, F-69310 Pierre-Bénite, France

²Lyon University, INSERM U1060, INRA U1235, CarMeN Laboratory, F-69921 Oullins, France

³Lyon University, INSA-Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM U1060, F-69621 Villeurbanne, France

⁴Hospices Civils de Lyon, F-69310 Pierre-Bénite, France

Lipid metabolism studies focus mainly on oxidation and storage but rarely on faecal elimination, which is needed to assess total lipid distribution during the postprandial period. The purpose of the present work was to set up and validate the analysis of lipid tracers in stools, with an aim of later using this methodology in studies of postprandial lipid tracer metabolism. Eight subjects received a mixture of [1,1,1-¹³C3]tripalmitin and [1,1,1-¹³C3]triolein with a fat-rich meal. The nature and amounts of ¹³C lipids excreted in stools during 3 days post-dose were determined by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS) analysis of fatty acid methyl esters (FAMES) from total fatty acid (TFA), free fatty acid (FFA) and triacylglycerol (TAG) fractions. The results were expressed as the Cumulative Tracer Recovery of the administered dose (CTR%). The quantities and labelling of FAMES were higher in FFA than in TAG, indicating that label loss was not due to a lack of digestive lipase activity. The labelling was higher for C16:0 than for C18:1. The CTRs were 7.03 ± 0.77% and 6.87 ± 0.91%, respectively, in TFA and FFA for [1-¹³C] C16:0, while they were 0.60 ± 0.15% and 0.51 ± 0.11% for [1-¹³C] C18:1 (mean ± sem). By studying the kinetics of lipid excretion from subjects, two groups emerged. The first one showed rapid excretion in stool #1, whereas the second showed slower excretion in stools #2–#3. A significant difference was found in the FFA in stool #1 for C16:0 ($p < 0.01$) and C18:1 ($p < 0.05$). Individual excretion kinetics showed marked variability. Nevertheless, the CTR over the 3-day study period was substantial and homogenous for all subjects. These results confirm that the assessment of faecal elimination is of great importance when establishing total lipid distribution during the postprandial period and validate the analysis of cumulative tracer loss during 72 h post-tracer ingestion. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Obesity results from the impaired distribution of dietary fat between oxidation and storage. The study of the metabolic fate of dietary lipids is of utmost importance because, in recent decades, obesity has become a major public health problem.^[1]

Isotopically labelled tracers are widely used for investigating lipid metabolism^[2–5] and lipid trafficking in man.^[6] For these studies, the tracers are ingested at the beginning of the trial, and blood and exhaled air samples are subsequently collected at regular intervals. ¹³C tracers permit exogenous lipids to be distinguished from endogenous lipids by

monitoring exhaled ¹³CO₂. Combined with the estimation of total CO₂ production measured by indirect calorimetry and using appropriate calculations, global lipid oxidation can be estimated.^[4,7,8] Analysis of blood samples permits the study of lipid profiles and the quantification of tracers in the different lipid compartments.

The tracers are detected by mass spectrometric analysis after standard sample treatment including the extraction, separation of the different lipid classes and transesterification. The fatty acids (FAs) are generally analysed as methyl esters, either with gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)^[9] or with gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS).^[10] Although GC/MS provides Tracer to Tracee Ratios (TTRs), a direct measure of the labelled to unlabelled molecule ratio, it requires Isotopic Enrichment (IE) higher than 0.5 mole %. On the contrary, GC/C/IRMS enables measurement of lower enrichment levels and administration of reduced amounts of tracers. Moreover, GC/C/IRMS permits the tracer to be detected after dilution in pools containing large amounts of the tracee molecule. The data are expressed as Atom Percent (AP), i.e. the ratio of the labelled atom number to the total number

* Correspondence to: M. Désage, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes (CRNH-RA), Centre Hospitalier Lyon Sud, Centre de Biologie et Anatomie Pathologie du Sud (CBAPS), Bât. 3D, 165 chemin du Grand Revoyet, F-69310 Pierre-Bénite, France.
E-mail: michel.desage@chu-lyon.fr

[†] Presented at the 6th Congress of the French Society of Stable Isotopes (Société Française des Isotopes Stables, SFIS) held 26–29 October 2010 in Toulouse, France.

Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation[☆]

Fabienne Laugerette^{a,b}, Cécile Vors^{a,b,c}, Alain Géloën^b, Marie-Agnès Chauvin^d, Christophe Soulage^{b,c}, Stéphanie Lambert-Porcheron^{e,g}, Noël Peretti^{c,g}, Maud Alligier^{c,e}, Rémy Burcelin^f, Martine Laville^e, Hubert Vidal^d, Marie-Caroline Michalski^{a,e,*}

^aINRA UMR1235, RMND, Villeurbanne, F-69621 France

^bINSA-Lyon, IMBL, Villeurbanne, F-69621 France

^cUniversité de Lyon, Villeurbanne, F-69621 France

^dINSERM U870, RMND, Oullins, F-69621 France

^eCRNH Rhône-Alpes, Oullins, F-69600 France

^fINSERM U858, I2MR, Toulouse, F-31432 France

^gHospices Civils de Lyon, Lyon, F-69008 France

Received 4 September 2009; received in revised form 13 November 2009; accepted 24 November 2009

Abstract

Low-grade inflammation is a risk factor for the onset of atherosclerosis. Little is known about the involvement of endotoxin absorption from the gut during the digestion of lipids. In the present study, we first investigated in humans the impact of a mixed meal containing dispersed lipids on postprandial endotoxemia and inflammation. We then investigated the effect of (i) oil emulsification *in vivo* in rats and (ii) fatty acid amounts *in vitro* using Caco-2 cells on postprandial endotoxemia. In humans, postprandial endotoxemia increased early after the meal. Moreover, we evidenced that the endotoxin receptor sCD14 increased during digestion and that chylomicrons could contribute to absorbed endotoxin transport. This could explain the significant peak of inflammatory cytokine IL-6 that we observed 2 h after the mixed meal. Interestingly, in rats, the emulsion led to both higher endotoxemia and hypertriglyceridemia than oil and compared to a control saline load. *In vitro*, incubation of Caco-2 cells with increasing fatty acid concentrations enhanced epithelial absorption of endotoxin. To our knowledge, this is the first study evidencing in healthy humans that, following a mixed meal containing lipids, increased endotoxemia is associated with raised sCD14 and a peak of IL-6. On a repeated basis, this may thus be a triggering cascade for the onset of atherosclerosis. In this respect, optimizing both dietary fat amount and structure could be a possible strategy to limit such low-grade endotoxemia and inflammation by the control of postprandial lipemia.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Nutrition; Digestion; Lipid; Endotoxin; Inflammation; Emulsion

1. Introduction

Metabolic diseases of nutritional origin, such as obesity and type 2 diabetes, are characterized by a subclinical inflammatory state that contributes to the development of atherosclerosis [1,2]. Although a correlation between high-fat diet and chronic inflammatory diseases has been shown [3], the specific factors that initiate and maintain low-grade inflammation remain largely unknown. In the case of type

2 diabetes, Creely et al. [4] report the presence in plasma of low doses of proinflammatory bacterial compounds, namely, endotoxins [lipopolysaccharides (LPS)]. Other authors have suggested a link between endotoxemia and atherosclerosis or incident cardiovascular disease events [5,6].

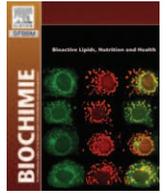
Endotoxins are components of gram-negative bacteria cell wall. Because many gram-negative bacteria are present in the intestinal microflora, representing more than 1 g of LPS being present in the gut [7], intestinal microflora has been suggested as a potential source for these circulating LPS, possibly via translocation [7]. Interestingly, the proportion of gram-negative bacteria in microflora is higher in obese subjects than in lean subjects [8,9]. Furthermore, the reservoir of proinflammatory LPS in the gut might be altered when the diet gets unbalanced [8]. One feature of dietary alterations in obesity and type 2 diabetes is increased fat abundance in the diet, and recent studies report a postprandial inflammation occurring during the digestion of a fat load [10]. Therefore, some authors hypothesized that the low-

Abbreviations: d_{32} , volume–surface mean diameter; CM, chylomicron; LPS, lipopolysaccharides; OA, oleic acid; TAG, triacylglycerol.

[☆] Disclosures: None of the authors had a conflict of interest.

* Corresponding author. INRA, UMR1235, Régulations Métaboliques Nutrition et Diabètes, Bâtiment IMBL, INSA-Lyon, 69621 Villeurbanne cedex, France. Tel.: +33 4 72 43 81 12; fax: +33 4 72 43 85 24.

E-mail address: marie-caroline.michalski@insa-lyon.fr (M.-C. Michalski).



Mini-review

Complex links between dietary lipids, endogenous endotoxins and metabolic inflammation

Fabienne Laugerette^{a,b,1}, Cécile Vors^{c,d,1}, Noël Peretti^{b,f}, Marie-Caroline Michalski^{d,e,*}

^a Université de Lyon, F-69100 Villeurbanne, France

^b INSERM, U870, RMND, F-69621 Villeurbanne, France

^c INSA-Lyon, IMBL, F-69621 Villeurbanne, France

^d INRA, UMR 1235, RMND, F-69921 Oullins, France

^e CRNH Rhône-Alpes, F-69921 Oullins, France

^f Hospices Civils de Lyon, Hôpital Femme Mère Enfant, F-69500 Bron, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 January 2010

Accepted 21 April 2010

Available online 28 April 2010

Keywords:

Nutrition

Obesity

Lipid

Inflammation

Endotoxemia

ABSTRACT

Metabolic diseases such as obesity are characterized by a subclinical inflammatory state that contributes to the development of insulin resistance and atherosclerosis. Recent reports also indicate that (i) there are alterations of the intestinal microbiota in metabolic diseases and (ii) absorption of endogenous endotoxins (namely lipopolysaccharides, LPS) can occur, particularly during the digestion of lipids. The aim of the present review is to highlight recently gained knowledge regarding the links between high fat diets, lipid digestion, intestinal microbiota and metabolic endotoxemia & inflammation.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, obesity outbreak is an important health problem due to its association with metabolic disorders such as type 2 diabetes, hyperlipidemia and hypertension. These metabolic diseases resulting of genetic, environmental and nutritional factors are characterized by a subclinical inflammatory state that contributes to the development of insulin resistance and atherosclerosis [1,2]. Although the markers of chronic inflammation such as C-reactive protein predictive of the development of atherosclerosis are clearly established, the factors responsible for the initiation and maintenance of the chronic inflammation remain to be elucidated [3]. It was however noticed very recently that (i) there are alterations of the intestinal microbiota in metabolic diseases and (ii) absorption of endotoxins (namely lipopolysaccharides, LPS) can occur [4,5]. Endotoxins, which are components of gram negative bacteria cell wall, can appear in blood circulation from intestinal microbiota via translocation [6].

New evidence supports the idea of a link between high fat diet and the release of endotoxins in plasma of mice and humans [4,7,8]. The different results suggest that a chronic fat-rich diet could result in increased endotoxemia and low-grade inflammation due to the repeated endotoxin absorption from the gut during the digestion of lipids, which in turn could increase the risk of insulin resistance and atherosclerosis. Such endotoxemia can be defined as “metabolic endotoxemia”, in contrast with other types of endotoxemia originating from exogenous bacterial infection or sepsis. Moreover, we recently evidenced that the structure of lipids in food could be one of the determinants of LPS absorption during fat digestion in non-pathological conditions [9].

The present review will thus discuss the different issues relating metabolic inflammation, intestinal microbiota, endogenous endotoxin absorption and the possible modulation by lipid structure.

2. Inflammation in metabolic diseases

The low-grade inflammation is a common feature in the pathophysiology of obesity and type 2 diabetes [3,10,11]. Moreover, such inflammation increases the risk of insulin resistance and atherosclerosis [12–16]. The inflammatory response is characterized by the increase of pro-inflammatory cytokines as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in plasma [17]. Nappo et al. have

* Corresponding author. UMR Régulations Métaboliques Nutrition et Diabètes, IMBL Building, INSA-Lyon, 11 avenue Jean Capelle, 69621 Villeurbanne Cedex, France. Tel.: +33 4 72 43 81 12; fax: +33 4 72 43 85 24.

E-mail address: marie-caroline.michalski@insa-lyon.fr (M.-C. Michalski).

¹ FL and CV contributed equally to the work.