



HAL
open science

Les adaptations du muscle squelettique à une surnutrition expérimentale

Kévin Seyssel

► **To cite this version:**

Kévin Seyssel. Les adaptations du muscle squelettique à une surnutrition expérimentale. Endocrinologie et métabolisme. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10284 . tel-01242171

HAL Id: tel-01242171

<https://theses.hal.science/tel-01242171>

Submitted on 11 Dec 2015

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.

N° d'ordre : 284-2015

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences - Santé

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 2 décembre 2015

par

Kévin SEYSSEL

Les adaptations du muscle squelettique à une surnutrition expérimentale

Directeur de thèse : Pr. Martine LAVILLE

JURY :

| | | |
|-----------------------------|--------------------|-----------------------|
| Université de Lyon | Président | Dr. Hubert VIDAL |
| Université de Saint-Etienne | Rapporteur | Pr. Damien FREYSSENET |
| Université de Lausanne | Rapporteur | Pr. François PRALONG |
| Université de Lyon | Examineur | Dr. Marie EL BABA |
| Université de Lausanne | Examineur | Pr. Luc TAPPY |
| Université de Lyon | Directeur de thèse | Pr. Martine LAVILLE |

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. H. HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. J-C. PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS | 1 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 4 |
| TABLE DES ILLUSTRATIONS | 6 |
| AVANT-PROPOS | 8 |
| RESUME | 11 |
| ABSTRACT | 12 |
| VALORISATION DU TRAVAIL DE THESE | 13 |
| CHAPITRE 1 : CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE | 17 |
| 1. L'obésité et le surpoids | 18 |
| 1.1 L'obésité et le surpoids en chiffres | 18 |
| 1.2 Définition de l'obésité et du surpoids | 19 |
| 1.3 Les causes de la surcharge pondérale | 22 |
| 1.3.1 Une balance énergétique positive | 22 |
| 1.3.2 Des prédispositions génétiques | 25 |
| 1.3.3 L'évolution des modes de vie | 27 |
| 2. Le muscle squelettique | 42 |
| 2.1 Rappel de la structure du muscle squelettique | 42 |
| 2.1.1 Les fibres musculaires striées | 43 |
| 2.1.2 Les myofibrilles | 43 |
| 2.1.3 Le sarcomère | 44 |
| 2.2 Le métabolisme glucido-lipidique et ses voies métaboliques | 45 |
| 2.2.1 Le métabolisme des glucides | 47 |
| 2.2.2 Le métabolisme des lipides | 49 |
| 2.2.3 Le carrefour métabolique de la glycolyse et de la beta-oxydation : le cycle de Krebs | 51 |
| 2.2.4 La phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire | 52 |
| 2.3 La régulation des flux métaboliques | 53 |
| 2.3.1 Le cycle de Randle, la compétition entre acide gras et glucose | 53 |
| 2.3.2 Le rôle central de la pyruvate déshydrogénase | 56 |
| 2.3.3 Le rôle central de la concentration en malonyl-CoA | 58 |
| 3. Les adaptations du muscle squelettique à la surnutrition | 60 |
| 3.1 Le modèle de surnutrition | 60 |
| 3.2 Les effets d'une surnutrition sur le métabolisme énergétique | 62 |
| 3.2.1 L'effet d'une surnutrition sur la dépense énergétique de repos | 63 |

| | | |
|---|--|------------|
| 3.2.2 | L'effet d'une surnutrition sur l'oxydation des substrats à jeun | 64 |
| 3.2.3 | L'effet d'une surnutrition sur la concentration en acides gras libres à jeun | 67 |
| 3.3 | Les acteurs moléculaires de l'orientation métabolique | 68 |
| 3.3.1 | SIRT1 | 69 |
| 3.3.2 | Régulation de l'expression de SIRT1 | 69 |
| 3.3.3 | Régulation de l'activité de SIRT1 | 70 |
| 3.3.4 | Les cibles de SIRT1 | 73 |
| CHAPITRE 2 : HYPOTHESES ET OBJECTIFS | | 76 |
| CHAPITRE 3 : MATERIELS ET METHODES | | 79 |
| 1. | Design des études | 80 |
| 1.1 | Etude n°1 : la surnutrition hyperlipidique | 82 |
| 1.2 | Etude n°2 : la surnutrition en fructose | 84 |
| 1.3 | Etude n°3 : la surnutrition hyperglucidique hyperlipidique | 85 |
| 2. | Les surnutritions | 86 |
| 2.1 | La surnutrition hyperlipidique (étude n°1) | 86 |
| 2.2 | La surnutrition en fructose (étude n°2) | 86 |
| 2.3 | La surnutrition hyperlipidique hyperglucidique (étude n°3) | 87 |
| 3. | Population | 88 |
| 3.1 | Procédures de recrutement | 88 |
| 3.2 | Visite de sélection | 88 |
| 4. | Méthodes et calculs | 90 |
| 4.1 | Le repas test | 90 |
| 4.2 | Le clamp euglycémique hyperinsulinémique | 92 |
| 4.1 | La calorimétrie indirecte | 94 |
| 4.2 | Les enquêtes alimentaires et les consignes diététiques | 97 |
| 4.3 | La DEXA | 98 |
| 4.4 | L'IRM | 99 |
| 4.5 | Les paramètres anthropométriques | 101 |
| 4.6 | L'activité physique | 101 |
| 4.7 | Biopsie de muscle squelettique et analyses réalisées | 102 |
| 4.7.1 | Réalisation de la biopsie | 102 |
| 4.7.2 | Analyse de l'expression génique | 102 |
| 4.7.3 | Mesure de la respiration mitochondriale | 106 |
| 4.7.4 | Mesure de l'acétylation de PGC1 α | 106 |
| 4.7.5 | Mesure du contenu en NAD ⁺ /NADH | 106 |
| 4.7.6 | Mesure protéique d'UCP3 | 106 |
| 4.8 | Dosages biochimiques | 107 |
| 4.9 | Analyses statistiques | 107 |
| CHAPITRE 4 : RESULTATS | | 108 |
| 1. | L'impact d'une surnutrition hyperlipidique sur le muscle squelettique (étude n°1) | 109 |
| 1.1 | Introduction | 109 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 1.2 | Article 1 : Regulation of Energy Metabolism and Mitochondrial Function in Skeletal Muscle During Overfeeding in Healthy Men | 110 |
| 1.3 | Discussion | 120 |
| 2. | L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2) | 123 |
| 2.1 | Introduction | 123 |
| 2.2 | Article 2 : Fructose overfeeding in first-degree relatives of type 2 diabetic patients impacts energy metabolism and mitochondrial functions in skeletal muscle | 125 |
| 2.3 | Discussion | 148 |
| 3. | L'étude de surnutrition hyperlipidique hyperglucidique (étude n°3) | 150 |
| 3.1 | Introduction | 150 |
| 3.2 | Analyses et résultats | 152 |
| 3.2.1 | Validation de la segmentation automatique | 152 |
| 3.2.2 | Exemple d'une quantification des volumes de tissu adipeux sous-cutané et viscéral | 153 |
| 3.2.1 | Exemple d'une évaluation de l'index de saturation et d'insaturation du tissu adipeux | 156 |
| | CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 157 |
| 1. | La surnutrition hyperlipidique vs. la surnutrition en fructose | 158 |
| 1.1 | Comparaison des effets sur les paramètres anthropométriques | 159 |
| 1.2 | Comparaison des effets sur les paramètres métaboliques | 159 |
| 1.3 | Comparaison de l'expression génique du muscle squelettique | 159 |
| 2. | Les modèles de surnutrition vs. la vie réelle ? | 163 |
| | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 166 |
| | ANNEXES | 184 |

« C'est ce que nous pensons déjà connaître qui nous empêche souvent d'apprendre. »

Claude Bernard

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les membres de mon jury de thèse de me faire l'honneur d'assister à ma soutenance.

Je remercie de tout cœur Martine Laville et Hubert Vidal pour m'avoir fait confiance et offert l'opportunité de réaliser cette thèse à leur côté.

Merci Martine pour votre écoute, votre réactivité et votre accompagnement durant ces trois années de thèse mais également durant mon master. J'ai adoré travailler avec vous autant sur le plan scientifique que sur le plan humain. L'expérience et l'expertise que j'ai acquises à vos côtés durant toutes ces années n'ont pas d'égaux.

Merci Hubert pour votre accompagnement et vos conseils durant toutes ces années. Vos talents scientifiques sont remarquables et votre supervision quant à la rédaction d'un article m'aura été d'une grande aide. J'ai aussi beaucoup appris à vos côtés.

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement Xavier Alliot qui fut le premier à me donner ma chance, à me faire confiance et sans qui je n'aurais pas été pris en stage au CRNH-RA. Quand je repense à quoi s'est joué mon avenir, cela ne tient qu'à un fil. Pour la petite histoire, au cours de mes études et notamment de mon master 1, j'avais la claire intention de faire mon stage en recherche clinique en nutrition. J'ai donc envoyé, comme de nombreux étudiants, une lettre de motivation accompagnée de mon CV par mail à Martine. Après avoir essuyé un premier refus, je ne me suis pas démonté et ai retenté ma chance en expliquant à Martine mon cursus de diététicien et mes motivations en quelques lignes. C'est alors que j'ai reçu un coup de téléphone de ta part Xavier et tu as décidé de me rencontrer. A la suite d'un bref entretien, tu m'as permis de réaliser avec toi mon stage de master 1. Puis l'histoire s'est alors prolongée en master 2, à croire que tu ne pouvais pas te passer de moi ;). L'Institut Paul Bocuse était pour moi l'occasion de bien manger, de préparer des buffets mais aussi de m'enrichir de ton vécu et de tes connaissances. Ton calme, ta joie de vivre et tes contrepèteries sont autant de qualités qui te caractérisent et font qu'il est agréable de travailler avec toi.

Je remercie grandement Pr. Emmanuel Disse pour tout. Tu as été avec Martine et Hubert un de mes mentors avec qui j'ai beaucoup appris. Tes passages réguliers sur le coup des 17h au CRNH-RA m'ont permis d'échanger sur le plan scientifique et d'apprendre de tes talents d'orateurs. Ton engagement dans la recherche est inébranlable et ton aide m'a été précieuse. Mille merci pour les biopsies Poly-Nut.

Merci Christine Maitrepierre, Jocelyne Peyrat et Edwige Bain pour votre investissement et votre aide afin que l'étude Poly-Nut se déroule dans les meilleures conditions. Ce ne fut pas choses faciles tous les jours mais je n'en garde que de bons souvenirs. Je ne le dirais jamais assez mais vous êtes des SUPERS infirmières et avez des compétences dépassant de loin ce qu'on attend d'une IDE. Christine ton aide informatique n'est ni qualifiable ni quantifiable

tant tes connaissances dépassent celles du commun des mortels, comme moi. Je dois dire que tu as dû me faire gagner pas loin de deux années de travail (et je ne mâche pas mes mots !!). Jocelyne ton aide à l'élaboration d'un planning fonctionnel (chose pas toujours évidente au vu des disponibilités de chacun) n'est là non plus pas mesurable. Je ne te remercierai jamais assez de m'avoir aidé à ce que chaque jour soit une journée qui se déroule sans encombre. Edwige merci aussi pour ton aide au quotidien et pour toutes tes questions qui m'ont amené à être meilleur pédagogue. Et merci à toutes les trois d'avoir échangé vos expériences, vos « trucs et astuces » et aussi de m'aider à raisonner scientifiquement parlant. Il est indéniable que le CRNH-RA ne serait pas ce qu'il est aujourd'hui sans vous.

Merci à Nathalie Feugier et Stéphanie Lambert-Porcheron pour m'avoir aidé à la rédaction du protocole Poly-Nut, pour m'avoir aidé à soumettre cette étude au CPP et pour m'avoir accompagné pour la bonne réalisation de cette étude. La réalisation d'une étude clinique n'est pas chose évidente et votre accompagnement m'aura été d'une grande aide.

Un grand merci tout particulier à Monique Sothier qui fut dans un premier temps mon professeur de diététique et qui fut par la suite une collègue de travail attentionnée, souriante et dynamique. Tes compétences en diététique m'ont été très utiles. Et merci aussi de m'avoir toujours accompagné à mes pauses cigarettes, nous permettant d'échanger.

Merci à Valérie, Laure et Corine pour tout, vous êtes une petite équipe géniale qui roule, avec qui j'adore travailler. J'ai beaucoup apprécié de collaborer avec vous tant sur le plan scientifique que sur le plan humain, ne changez pas.

Merci à Pascale Guyot, Zohra Bechir et Sylvie Normand pour m'avoir accompagné pendant toute cette période. Heureusement que vous êtes là pour nous simplifier le travail de part votre investissement dans tous les projets du CRNH-RA. Zohra, une secrétaire discrète et efficace, Sylvie une ingénieure dynamique et réactive et Pascale une ARC un peu « caliméro » mais très carrée et ayant une expertise complète sur de nombreux aspects de la recherche.

Un grand merci au plateau génomique de Carmen, Emmanuelle Meugnier, Sandra Pessenti et Emmanuelle Loizon pour tout. Vous êtes juste formidables !!! Sans vous, l'étude Poly-Nut ne pourrait pas avoir d'analyses génétiques dignes de ce nom, heureusement que vous êtes là. Merci aussi pour votre bonne humeur, c'est toujours aussi dynamisant pour moi et cela me rebooste toujours après vous avoir vu. Un grand merci à Emmanuelle Meugnier pour ton aide précieuse sur le plan scientifique et pour tes talents de gestion de données issues de puces, sans toi ma thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui. Un grand merci aussi à Sandra et Manue pour m'avoir appris à faire une extraction d'ARNm et surtout pour votre bonne humeur. Un grand merci à Stéphanie Chanon, de toujours m'aider pour Poly-Nut.

Un grand merci à tous les doctorants de Carmen qui m'ont facilement intégré à leurs sorties dans Lyon autour d'une bière et qui était toujours là en cas de pépin. Même si je n'étais pas dans le même bâtiment que vous, votre bureau m'accueillait toujours les bras ouverts.

Mille merci à Caroline Romestaing et à Claude Duchamps qui furent mes professeurs durant

mon master et qui furent aussi ceux qui me donnèrent la chance de faire de l'enseignement. Sans vous je n'aurais pas pu être moniteur durant ces trois années de thèse et je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir laissé l'opportunité d'être moniteur car je sais maintenant que l'enseignement devrait faire partie intégrante de ma carrière professionnelle.

Merci Emilie Blond, Julie-Anne Nazarre, Cécile Vors et Maud Alligier pour tout !! Votre bonne humeur, vos qualités scientifiques, votre générosité et toutes vos autres qualités sont autant de choses qui font qu'il est plaisant de travailler avec vous. Emilie, notre sang de chiti fait que nous avons les mêmes prérogatives à savoir le café et la clope (sans parler des frites ;)). Un grand merci à toi de m'avoir montré le chemin.

Un merci tout particulier à Jocelyne Draï. Je vous remercie de toujours m'avoir aidé à trouver un coin de paillasse quand j'en avais besoin et surtout de toujours simplifier les choses. Il est évident que sans vous le CRNH-RA ne serait pas ce qu'il est non plus.

Merci à Pierre Jean Valette, Nathalie Bazin, Olivier Beuf, Hélène Ratiney et toute l'équipe des manip radio (Djodjo, Doomy, Hugo et tous les autres) de m'avoir accompagné dans l'élaboration de la partie imagerie de Poly-Nut et aussi dans sa réalisation. Les relations humaines sont importantes pour le bon déroulement d'un protocole et vous êtes toujours agréables, réactifs et arrangeants.

Un grand merci à Stéphanie Auboussier, Colin Fatin et Chantal Simon pour vos conseils d'expert sur l'activité physique.

Merci à Aurélie Leroux et Bérénice Segrestin, qui ont su prendre en main l'étude Poly-Nut pour me laisser le temps d'écrire ma thèse. Merci beaucoup pour votre investissement dans ce projet. Je vous souhaite beaucoup de réussite pour la suite de votre parcours professionnel et j'espère que vous pourrez poursuivre en thèse.

La DEXA a toujours été un bon moment pour moi, je te remercie beaucoup Pascale Nuvoli d'avoir fait qu'il est simple d'avoir des rendez-vous pour mes sujets et qu'il est agréable de papoter avec toi.

Je remercie aussi mes ami(e)s qui se reconnaîtront avec qui j'adore passer du temps, faire la fête et sur qui je peux compter à n'importe quelle heure de la nuit.

Pour finir, je tiens à remercier tout particulièrement mes parents qui ont su tirer le meilleur de moi-même. Vous êtes des parents géniaux et je ne serai pas là où j'en suis sans vous. Vous avez su éveiller ma curiosité scientifique et m'avez toujours fait confiance. Il a été très important pour moi de vous avoir à mes côtés. Je suis fier de vous avoir comme parents. Je remercie aussi mes trois sœurs (Alicia, Marine et Ophélie) d'être là pour moi, avec d'un côté Al qui m'a ouvert le chemin de l'enseignement supérieur et Marine et Ophél pour la pédagogie et la patience que j'ai acquises grâce à vous.

Un grand merci à Mélanie Bonnet avec qui je partage ma vie, qui a su me rassurer dans mes moments de doutes et qui a toujours su me redonner le sourire. Merci à toi pour ta joie de vivre et ton amour.

Liste des abréviations

| Abréviation | Signification |
|--------------------|--|
| ACBP | Acyl-CoA Binding Protein |
| ACC ou ACACA | Acétyl-CoA Carboxylase |
| ACL | ATP Citrate Lyase |
| ACS | Acétyl-CoA Synthétase |
| ADN | Acide DésoxyriboNucléique |
| ADP | Adénine Di-Phosphate |
| AEJ | Apport Energétique Journalier |
| AGCC | Acide Gras à Chaine Courte |
| AGCL | Acide Gras à Chaine Longue |
| AGCM | Acide Gras à Chaine Moyenne |
| AGL | Acide Gras Libre |
| AGMI | Acide Gras Mono-Insaturé |
| AGPI | Acide Gras Poly-Insaturé |
| AGS | Acide Gras Ssaturé |
| AMP | Adénine Mono-Phosphate |
| AMPK | AMP-activated protein kinase |
| ANSES | Agence Nationale de SEcurité Sanitaire de l'alimentation |
| ANSM | Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé |
| AP | Activité Physique |
| ATP | Adénine Tri-Phosphate |
| CAT | Carnitine Acyl-Tranf érase |
| CCPPRB | Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale |
| CHREB | CarboHydrate Responsive Element-Binding Protein |
| CIQUAL | Centre d'Information sur la QUALité des Aliments |
| COX | Cytochrome C Oxydase |
| CPT1,CPT1m,CPT1B | Carnitine Palmitoyl-Tranf érase 1 |
| CPT2 | Carnitine Palmitoyl-Tranf érase 2 |
| CREB | CRE-Binding Protein |
| CRIPB | Centre de Recherche de l'Institut Paul Bocuse |
| CRNH-RA | Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes |
| CytC | Cytochrome C |
| DER | Dépense Energétique de Repos |
| FABPc | Fatty Acid Binding Protein cytosolic |
| FABPpm | Fatty Acid Binding Protein plasma membrane |
| FAD | Flavine Adénine Dinucléotide |
| FADH ₂ | Flavine Adénine Dinucléotide (réduit) |
| FAS | Fatty Acid Synthase |
| FAT/CD36 | Fatty Acid Translocase |
| FATP1/4 | Fatty Acid Transport Protein 1/4 |
| FOXO1 | Forkhead boX O1 |
| G6P | Glucose-6-Phosphatase |
| GDP | Guanosine DiPhosphate |
| Glut4 | Glucose transporter 4 |
| GTP | Guanosine TriPhosphate |
| IDF | International Diabetes Federation |

| | |
|------------------|--|
| IMC | Indice de Masse Corporelle |
| INSEE | Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques |
| LKB1 | Liver Kinase B1 |
| LPL | LipoProtéine-Lipase |
| MB | Métabolisme de Base |
| MLYCD | MaLonYl-CoA Decarboxylase |
| NAD ⁺ | NicotinAmide Dinucléotide |
| NADH | Nicotinamide Adenine Dinucleotide (réduit) |
| NAM | NicotinAMide |
| NAMPT | NicotinAMide PhosphoribosylTransferase |
| NHANES | National Health and Nutrition Examination Survey |
| NMNAT | Nicotinamide MonoNucleotide AdenylylTransferase |
| NRF1 | Nuclear Respiratory Factor 1 |
| OMS | Organisation Mondiale de la Santé |
| PDH | Pyruvate DésHydrogénase |
| PDK | Pyruvate Déshydrogénase Kinase |
| PDK4 | Pyruvate Déshydrogénase Kinase 4 |
| PDP | Pyruvate Déshydrogénase Phospatase |
| PFK1 | Phospho-Fructo-Kinase 1 |
| PGC1 α | Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha |
| PP2A | Protein Phosphatase 2A |
| PPAR | Peroxisome Proliferator-Activated receptor |
| QR | Quotient Respiratoire |
| QRNP | Quotient Respiratoire Non Protéique |
| SEM | Erreur standard à la moyenne |
| SIRT1 | SIRTuin 1 |
| SREBP1c | Sterol Regulatory Element Binding transcription factor 1 |
| TC | Thermogénèse Corporelle |
| TFAM | Transcription Factor A Mitochondrial |
| TG | TriGlycéride |
| TPP | Thermogénèse Post-Prandiale |
| UCP | UnCoupling Protein |
| VCO ₂ | Volume de dioxyde de carbone (produit) |
| VLDL | Very Low-Density Lipoprotein |
| VO ₂ | Volume d'oxygène (consommé) |

Table des illustrations

Liste des figures :

| | |
|---|----|
| <u>Figure 1</u> : Evolution de la prévalence adulte de l'obésité en France et aux Etats-Unis | 19 |
| <u>Figure 2</u> : La répartition de la population française en fonction de l'IMC | 20 |
| <u>Figure 3</u> : La balance énergétique à l'état d'équilibre | 23 |
| <u>Figure 4</u> : Illustration de l'adaptabilité du corps humain à l'apport calorique | 26 |
| <u>Figure 5</u> : Apports caloriques journaliers moyens (A) et évolution moyenne du poids corporel (B) en fonction du type d'enrichissement en lipides du régime | 32 |
| <u>Figure 6</u> : Apports caloriques moyens après les trois types de petit déjeuner (normal, riche en lipides et riche en glucides) | 33 |
| <u>Figure 7</u> : Activité physique des sujets de la cohorte 1 et 2 en fonction du type de régime | 35 |
| <u>Figure 8</u> : Apports caloriques journaliers moyens avant (baseline) et après (week 4) la prise de soda et la prise de bonbons (jelly beans) | 37 |
| <u>Figure 9</u> : Pourcentage de risque de développer une obésité ou un diabète de type 2 en fonction des habitudes de vies | 40 |
| <u>Figure 10</u> : Structure globale du muscle squelettique | 43 |
| <u>Figure 11</u> : Structure d'une myofibrille | 44 |
| <u>Figure 12</u> : Type de métabolisme utilisé en fonction de la puissance et du temps de l'exercice | 45 |
| <u>Figure 13</u> : Schéma globale simplifié du métabolisme aérobie des glucides et des lipides | 46 |
| <u>Figure 14</u> : Schéma simplifié de la glycolyse | 48 |
| <u>Figure 15</u> : Passage des acides gras du sang au milieu intracellulaire du muscle squelettique en fonction de la taille des acides gras | 50 |
| <u>Figure 16</u> : Schéma simplifié de la β -oxydation | 51 |
| <u>Figure 17</u> : Le cycle de Krebs | 52 |
| <u>Figure 18</u> : La phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale | 53 |
| <u>Figure 19</u> : Mécanisme d'inhibition de l'oxydation des glucides par les acides gras (A) et mécanisme d'inhibition de l'oxydation des lipides par le glucose (B) | 55 |
| <u>Figure 20</u> : Mécanisme de régulation de l'activité de la PDH par PDK et PDP | 57 |
| <u>Figure 21</u> : Mécanisme de régulation de l'activité de l'ACC et de MLYCD par l'AMPK et PP2A | 58 |
| <u>Figure 22</u> : Réaction de déacétylation catalysée par SIRT1 | 69 |
| <u>Figure 23</u> : Modulation de l'activité de SIRT1 par le ratio $NAD^+/NADH$ | 70 |
| <u>Figure 24</u> : Régulation de l'activité de l'AMPK par le ratio AMP/ATP et le lien avec l'activation de SIRT1 | 71 |

| | |
|---|-----|
| <u>Figure 25</u> : Régulation de l'expression des gènes liés au métabolisme par SIRT1 au niveau musculaire | 75 |
| <u>Figure 26</u> : Schéma général des études | 81 |
| <u>Figure 27</u> : Flow chart de l'étude | 82 |
| <u>Figure 28</u> : Design des journées d'exploration métabolique de l'étude n°1 | 83 |
| <u>Figure 29</u> : Design des journées d'exploration métabolique de l'étude n°2 | 84 |
| <u>Figure 30</u> : Design des journées d'exploration métabolique de l'étude n°3 | 85 |
| <u>Figure 31</u> : Design du repas test de la surnutrition hyperlipidique (étude n°1) | 90 |
| <u>Figure 32</u> : Design du clamp euglycémique hyperinsulinémique à deux paliers d'insuline | 93 |
| <u>Figure 33</u> : Photo d'un sujet sous un canopy | 95 |
| <u>Figure 34</u> : Exemple de photo du support | 97 |
| <u>Figure 35</u> : Illustration de la quantification du volume de tissu adipeux viscéral et sous-cutané | 99 |
| <u>Figure 36</u> : Résultats de corrélation entre la méthode automatique et manuelle en fonction du tissu adipeux considéré (A : viscéral et B : sous-cutané) | 152 |
| <u>Figure 37</u> : Exemple de l'évolution du volume de tissu adipeux sous-cutané et viscéral en fonction de la zone considérée (de L2 à L4) | 155 |
| <u>Figure 38</u> : Exemple d'un spectre obtenu à partir du tissu adipeux sous-cutané | 156 |

Liste des tables :

| | |
|--|-----|
| <u>Table 1</u> : Paramètres considérés pour diagnostiquer le syndrome métabolique | 21 |
| <u>Table 2</u> : Revue des études de surnutrition évaluant à jeun la dépense énergétique de repos, l'oxydation lipidique et glucidique et la concentration en acides gras libres | 66 |
| <u>Table 3</u> : Composition macronutritionnelle de la surnutrition hyperlipidique | 86 |
| <u>Table 4</u> : Composition macronutritionnelle des 4 surnutritons hyperglucidique hyperlipidique | 87 |
| <u>Table 5</u> : Critères de sélection des études de surnutritons | 89 |
| <u>Table 6</u> : Composition macronutritionnelle du repas test (A) de la surnutrition en lipides et (B) de la surnutrition hyperglucidique hyperlipidique | 91 |
| <u>Table 7</u> : Coefficients DICE entre la méthode de segmentation manuelle et automatique | 153 |

Avant-propos

L'obésité est une pathologie caractérisée par un excès majeur de tissu adipeux néfaste pour la santé. Souvent associée à un rejet social, à un inconfort physique et à un mal-être psychologique profond, l'obésité est aussi un facteur de risque important de développer de nombreuses pathologies, qu'elles soient métaboliques, endocrines, cardiovasculaires ou encore articulaires. De plus, l'obésité est un handicap physique majeur dans la vie quotidienne puisqu'elle perturbe fortement la pratique de certaines activités comme le sport, les déplacements ou encore la sexualité.

Les principales causes de cette maladie sont en partie imputables aux changements drastiques de nos modes et habitudes de vie. Le passage d'un environnement rural à un environnement urbain, l'avènement de l'industrie et de la technologie, la disponibilité croissante d'aliments à haute densité énergétique sont autant de facteurs favorisant l'obésité avec d'un côté, une surconsommation alimentaire et d'un autre côté, une sédentarité accrue.

La balance énergétique d'un individu est composée, d'un côté, des apports d'énergie fournis par l'alimentation (entrées) et d'un autre côté des dépenses d'énergie liées à l'activité physique et au maintien des fonctions vitales de l'organisme (sorties). Durant les phases précoces de prise de poids aboutissant à l'obésité, cette balance énergétique est déséquilibrée en faveur des entrées. Les apports alimentaires excédentaires vont tout d'abord contribuer à l'accumulation de triglycérides au niveau des adipocytes composant le tissu adipeux blanc et, dans certaines conditions, induire l'accumulation de lipides dans des organes non prévus à cet effet comme le foie, le muscle et le pancréas, entraînant ainsi des phénomènes de lipotoxicité. L'évolution fulgurante de l'obésité dans les sociétés occidentales, associée à un coût sociétal important, a poussé de nombreuses équipes de recherche à décrypter les causes et les conséquences de cette pathologie complexe.

De nombreuses études ont été réalisées chez l'animal, comme chez l'Homme, pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents conduisant à l'obésité. Que ce soit à l'aide de modèles animaux génétiquement obèses ou développant une obésité à la suite de certains régimes, l'obésité est décortiquée sous tous ses aspects afin d'essayer d'endiguer ce fléau des temps modernes. La recherche clinique est indispensable pour pouvoir transposer les observations et les mécanismes retrouvés chez l'animal à l'Homme. Ainsi, de nombreuses

études de surnutrition ont vu le jour chez l'Homme afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la phase précoce de prise de poids. Beaucoup d'études ont ainsi analysé l'effet d'une surnutrition hypercalorique sur le tissu adipeux blanc, mais relativement peu d'entre elles ont été consacrées à leur influence sur le muscle squelettique. Le muscle squelettique est un organe essentiel dans la régulation du métabolisme global puisqu'il représente environ 40% du poids corporel et qu'il est responsable au repos d'environ 20% de la dépense énergétique. De plus, il est très important de noter que dans la vie quotidienne, la quasi-totalité de l'énergie dépensée, en supplément du métabolisme de repos, est due à l'activité musculaire. Une dysfonction du métabolisme musculaire est sans nul doute d'une importance majeure dans la genèse de l'obésité et dans l'établissement des pathologies associées à celle-ci.

Le but de ces trois années de thèse a été double, avec d'un côté l'analyse et l'exploitation de résultats de deux précédentes études déjà réalisées et, d'un autre côté, la conception et la mise en place d'une nouvelle étude clinique de surnutrition.

Ce manuscrit présentera ainsi l'analyse et les résultats de deux précédentes études visant à déterminer les effets d'une balance énergétique positive chez l'Homme sur le métabolisme énergétique au sens large, en lien avec les modifications géniques et oxydatives du muscle squelettique (Surnutrition hyperlipidique (étude n°1) et Surnutrition en fructose (étude n°2)). La première étude a été réalisée en France, en collaboration entre le Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes et son homologue auvergnat, le Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne. Cette étude consistait à évaluer les effets d'une surnutrition hypercalorique hyperlipidique pendant une durée de 56 jours. La seconde étude a été réalisée en Suisse, au sein du département de physiologie de l'Université de Lausanne et avait pour but d'évaluer l'impact d'une surnutrition hypercalorique en fructose pendant une durée d'une semaine.

En parallèle, une nouvelle étude de surnutrition hyperglucidique hyperlipidique nommée Poly-Nut a été conçue et débutée afin de déterminer si un apport journalier en polyphénols pourrait contrecarrer les effets néfastes d'une surnutrition de 31 jours (étude n°3). La conception, la rédaction et la mise en place de cette étude m'ont ainsi permis de réaliser chacune des étapes de la vie d'un protocole de recherche clinique. A partir d'une hypothèse, j'ai ainsi pu rédiger le protocole Poly-Nut qui a été présenté et accepté par le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) et par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM). Par la

suite, j'ai eu la mission de mettre en place cette étude clinique au CRNH-RA et de coordonner l'équipe de recherche. Un total de 21 sujets a déjà été recruté pour l'étude et il reste encore 21 sujets à recruter. Cette étude en double aveugle étant toujours en cours, nous n'aborderons pas, dans ce manuscrit, des effets potentiellement protecteurs de la supplémentation en polyphénols permettant de lutter contre les effets métaboliques délétères de la surnutrition, mais nous nous intéresserons tout particulièrement au design de l'étude et à la partie imagerie très novatrice que nous avons développée.

Résumé

L'obésité est un problème majeur de santé publique. Le modèle de surnutrition, consistant à induire une balance énergétique positive sur une période donnée, nous permet d'étudier les phases précoces de l'obésité. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié les effets d'une surnutrition hyperlipidique (+757 kcal/j) de 56 jours sur l'oxydation des substrats, l'expression génique par puce à ADN, la fonction mitochondriale, le contenu intracellulaire en NAD⁺ et l'acétylation de PGC1 α du muscle squelettique chez des sujets sains. En parallèle, nous avons étudié les effets d'une surnutrition riche en fructose (+3.5g de fructose par kg de masse maigre par jour) de 7 jours sur l'oxydation des substrats et l'expression génique par puce à ADN du muscle squelettique chez des sujets apparentés diabétiques de type 2 et nous avons réalisé des études *in vitro* sur myotubes humains afin d'identifier le médiateur contribuant aux effets du fructose.

La surnutrition hyperlipidique et la surnutrition riche en fructose contribuent toutes deux à augmenter le poids corporel et le stockage ectopique de lipides des sujets. Ces modifications sont accompagnées par l'oxydation préférentielle des glucides au détriment des lipides. La surnutrition hyperlipidique induit, au niveau musculaire, une diminution de l'expression de PDK4 qui pourrait être la conséquence de la diminution de la concentration en NAD⁺ associée à la baisse de l'activité de SIRT1 comme supportée par l'hyperacétylation de PGC1 α . Bien que l'activation de la voie SIRT1/PGC1 α semble réduite, la surnutrition hyperlipidique est associée à une augmentation de l'expression des gènes liés à la mitochondrie. La surnutrition riche en fructose induit quant à elle, au niveau musculaire, une baisse de l'expression de nombreux gènes liés à l'oxydation des lipides et à la mitochondrie comme CPT1 et MLYCD. Les études *in vitro* suggèrent que le fructose agit de manière indirecte sur le muscle squelettique et que ses effets ne sont pas médiés par l'acide urique, le lactate et le monoxyde d'azote.

Ce travail de thèse met en lumière les conséquences d'une balance énergétique positive induite par la surconsommation de lipides ou de fructose, que nous pouvons retrouver dans la population générale, sur le métabolisme énergétique et l'expression génique du muscle squelettique.

Mot clés : *obésité, surnutrition, balance énergétique positive, expression génique du muscle squelettique, SIRT1, PGC1 α , PDK4, CPT1, MLYCD, oxydation lipidique.*

Abstract

Obesity is a major public health problem. The model of overfeeding, inducing a positive energy balance on a specific period, allows us to study the early stages of obesity. In this thesis, we studied the effects of a high-fat overfeeding (+757 kcal/d) during 56 days on substrate oxidation, gene expression assess by microarray, mitochondrial function, intracellular NAD⁺ content, and acetylation of PGC1 α in skeletal muscle of healthy subjects. In parallel, we studied the effects of high fructose overfeeding (+3.5g of fructose per kg of fat free mass per day) during 7 days on substrate oxidation and gene expression assess by microarray in skeletal muscle of first-degree relatives of type 2 diabetic patients and we performed *in vitro* studies with human myotubes to identify the mediator contributing to the fructose effects.

High-fat and high-fructose overfeeding both contribute to increase body weight and ectopic lipids accumulation. These changes are associated with a preferential oxidation of carbohydrates instead of lipid. High-fat overfeeding induces in skeletal muscle, a decrease in PDK4 expression that could be the consequences of decreased NAD⁺ concentration associated with a decreased SIRT1 activity as supported by the hyperacetylation of PGC1 α . Although this reduction of the SIRT1/PGC-1 α pathway appears, the high-fat overfeeding is associated with increased mitochondrial gene expression. The high-fructose overfeeding induces in skeletal muscle a decrease in many genes expression related to lipid oxidation and mitochondria as CPT1 and MLYCD. *In vitro* experiments suggest an indirect action of fructose in skeletal muscle, which seemed to be independent from lactate, uric acid and nitric oxide.

This thesis highlights the consequences of a positive energy balance induced by overconsumption of lipid or fructose, which we can find in the general population, on energy metabolism and skeletal muscle gene expression.

Key words : *obesity, overfeeding, positive energy balance, skeletal muscle gene expression, SIRT1, PGC1 α , PDK4, CPT1, MLYCD, lipid oxidation.*

Valorisation du travail de thèse

- **Articles scientifiques présentés dans ce manuscrit (publiés et soumis)**

Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, Chanseaume E, Loizon E, Cantos C, Disse E, Lambert-Porcheron S, Brozek J, Blond E, Rieusset J, Morio B, Laville M, Vidal H ; Regulation of energy metabolism and mitochondrial function in skeletal muscle during lipid overfeeding in healthy men ; *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (2014) 99(7):E1254-62. (Etude n°1)

Seyssel K, Meugnier E, Lê KA, Disse E, Blond E, Pays L, Nataf S, Brozek J, Laville M, Vidal H, Tappy L ; Fructose overfeeding in first-degree relatives of type 2 diabetic patients impacts energy metabolism and mitochondrial functions in skeletal muscle ; *Diabetes, Obesity and Metabolism* (soumis 2015) (Etude n°2).

- **Autres articles scientifiques en lien avec le travail de thèse (publiés et soumis)**

Alligier M, Seyssel K, Disse E, Laville M ; Le tissu adipeux : couleur, localisation, fonctions et autres données nouvelles ; *Mise au point clinique d'endocrinologie nutrition et métabolisme* (2013) 185-206 (Annexe 7).

Jenkins BJ; Seyssel K; Ament Z; Summerhill K; Alligier M; Laville M; Ronis M; Koulman A ; Dairy biomarker divergence: Separating curds and whey ; *American Journal of Clinical Nutrition* (soumis 2015) (Annexe 8).

- **Communications orales réalisées à partir des travaux de thèse**

Seyssel K, Laville M ; Polyphenols supplementation prevents overfeeding-induced insulin resistance ? ; *European PhD Workshop Scientific Writing for food research* ; Ecully (France) ; 4-5 juillet 2013.

Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, Loizon E, Chanseaume E, Cantos C, Disse E, Lambert-Porcheron S, Brozek J, Blond E, Rieusset J, Morio B, Laville M, Vidal H ; La régulation du métabolisme énergétique dans le muscle squelettique au cours d'une surnutrition hyperlipidique chez l'homme sain ; 1ères Assises de Nutrition et Métabolisme ; Saint Galmier (France) ; 16 et 17 octobre 2013.

Seyssel K ; Conséquences expérimentales observées lors d'une surnutrition ; *Journée Scientifique de l'IHU OpeRa* ; Bron (France) ; 21 octobre 2013.

Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, Loizon E, Chanseaume E, Cantos C, Disse E, Lambert-Porcheron S, Brozek J, Blond E, Rieusset J, Morio B, Laville M, Vidal H ; La régulation du métabolisme énergétique dans le muscle squelettique au cours d'une surnutrition hyperlipidique chez l'homme sain ; 11^{èmes} Journées Francophones de Nutrition ; Bordeaux (France) ; 11-13 décembre 2013.

Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, Loizon E, Chanseau E, Cantos C, Disse E, Lambert-Porcheron S, Brozek J, Blond E, Rieusset J, Morio B, Laville M, Vidal H ; La régulation du métabolisme énergétique dans le muscle squelettique au cours d'une surnutrition hyperlipidique chez l'homme sain ; *30^{èmes} Congrès de l'Association Française d'Etudes et de Recherches sur l'Obésité* ; Dijon (France) ; 16 et 17 janvier 2014.

Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, Loizon E, Chanseau E, Cantos C, Disse E, Lambert-Porcheron S, Brozek J, Blond E, Rieusset J, Morio B, Laville M, Vidal H ; La régulation du métabolisme énergétique dans le muscle squelettique au cours d'une surnutrition hyperlipidique chez l'homme sain ; *19^{ème} Journée Scientifique de l'EDISS* ; Villeurbanne (France) ; 16 octobre 2014.

Seyssel K ; Impact of dietary polyphenols on insulin resistance induced by overnutrition : the PolyNut clinical trial ; *Journée Scientifique de l'IHU OpeRa* ; Lyon (France) ; 1^{er} décembre 2014.

Seyssel K, Meugnier E, Laville M, Vidal H, Lê KA, Tappy L ; Impact of high fructose diet on skeletal muscle metabolism in healthy men ; *21th European Congress on Obesity* ; Prague (République tchèque) ; 6-9 mai 2015.

- ***Posters commentés réalisés à partir des travaux de thèse***

Seyssel K, Alligier M, Gabert L, Meugnier E, Lambert-Porcheron S, Chanseau E, Debard C, Sauvinet V, Morio B, Vidal H, Laville M ; L'accumulation de tissu adipeux viscéral est associée aux caractéristiques du tissu adipeux sous cutané au cours d'une période de surnutrition chez l'homme sain ; *10^{èmes} Journées Francophones de Nutrition* ; Lyon (France) ; 12-14 décembre 2012.

Alligier M, Seyssel K, Gabert L, Meugnier E, Lambert-Porcheron S, Chanseau E, Debard C, Sauvinet V, Morio B, Vidal H, Laville M ; L'accumulation de tissu adipeux viscéral est associée aux caractéristiques du tissu adipeux sous cutané au cours d'une période de surnutrition chez l'homme sain ; *29^{èmes} Congrès de l'Association Française d'Etudes et de Recherches sur l'Obésité* ; Paris (France) ; 17 et 18 janvier 2013.

Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, Loizon E, Chanseau E, Cantos C, Disse E, Lambert-Porcheron S, Brozek J, Blond E, Rieusset J, Morio B, Laville M, Vidal H ; La régulation du métabolisme énergétique dans le muscle squelettique au cours d'une surnutrition hyperlipidique chez l'homme sain ; *30^{èmes} Congrès de l'Association Française d'Etudes et de Recherches sur l'Obésité* ; Dijon (France) ; 16 et 17 janvier 2014.

Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, Loizon E, Chanseau E, Cantos C, Disse E, Lambert-Porcheron S, Brozek J, Blond E, Rieusset J, Morio B, Laville M, Vidal H ; La régulation du métabolisme énergétique dans le muscle squelettique au cours d'une surnutrition hyperlipidique chez l'homme sain ; *Les Rencontres Scientifiques CENS* ; Lyon (France) ; 2 et 3 octobre 2014.

Jenkins B, Seyssel K, Summerhill K, Alligier M, Laville M, Koulman A ; Dairy fat biomarker response to dairy fat overfeeding ; *21th European Congress on Obesity* ; Prague (République tchèque) ; 6-9 mai 2015.

- **Autres articles scientifiques (publiés)**

Allirot X, Saulais L, Seyssel K, Graeppi-Dulac J, Roth H, Charrié A, Draï J, Goudable J, Blond E, Disse E, Laville M ; Increasing eating frequency contributes to a better control of appetite in lean men ; *Physiology & Behavior* (2013) 110-111:169-78 (Annexe 9).

Allirot X, Seyssel K, Saulais L, Roth H, Charrié A, Draï J, Goudable J, Blond E, Disse E, Laville M ; Effects of a breakfast spread out over time on the food intake at lunch and the hormonal responses in obese men ; *Physiology & Behavior* (2014) 127C:37-44 (Annexe 10).

Seyssel K, Allirot X, Nazare JA, Blond E, Charrié A, Mialon A, Draï J, Laville M, Disse E ; Ghrelin peaks after meal initiation: appetite comes with eating ? ; *European Journal of Clinical Nutrition* (2015) 10.1038/ejcn.2015.181.

- **Autres communications orales réalisées**

Seyssel K, Nazare JA, Allirot X ; Satiety and eating behavior : Concepts and methods, A case study on meal fractionning and consequences ; *Professional Seminars of the Institut Paul Bocuse Research Centre* ; Ecully (France) ; 7 février 2014.

- **Autres posters commentés**

Allirot X, Seyssel K, Saulais L, Roth H, Disse E, Laville M ; Le fractionnement alimentaire : quels effets sur l'appétit et le métabolisme chez l'obèse ? ; *29^{èmes} Congrès de l'Association Française d'Etudes et de Recherches sur l'Obésité* ; Paris (France) ; 17 et 18 janvier 2013.

Seyssel K, Allirot X, Graeppi Dulac J, Nazare JA, Laville M, Disse E ; The ghrelin peak is a consequence rather than a cause of meal initiation in human ; *20th European Congress on Obesity*, Liverpool (Angleterre) ; 12-15 mai 2013.

Allirot X, Seyssel K, Saulais L, Disse E, Roth H, Laville M ; Increasing eating frequency is not an adequate strategy for obese men to better control their appetite ; *20th European Congress on Obesity*, Liverpool (Angleterre) ; 12-15 mai 2013.

Seyssel K, Allirot X, Graeppi Dulac J, Nazare JA, Laville M, Disse E ; Le pic de ghréline: cause ou conséquence de l'initiation du repas chez l'Homme ? ; *11^{èmes} Journées Francophones de Nutrition* ; Bordeaux (France) ; 11-13 décembre 2013.

Seyssel K, Allirot X, Graeppi Dulac J, Nazare JA, Laville M, Disse E ; Le pic de ghréline: cause ou conséquence de l'initiation du repas chez l'Homme ? ; *30^{èmes} Congrès de l'Association Française d'Etudes et de Recherches sur l'Obésité* ; Dijon (France) ; 16 et 17 janvier 2014.

Seyssel K, Allirot X, Graeppi Dulac J, Nazare JA, Laville M, Disse E ; Le pic de ghréline: cause ou conséquence de l'initiation du repas chez l'Homme ? ; *Les Rencontres Scientifiques CENS* ; Lyon (France) ; 2 et 3 octobre 2014.

- **Collaborations**

Monnier F, Ratiney H, Leporq B, Laville M, Seyssel K, Valette PJ, Beuf O ; Abdominal fat segmentation using T1- and T2*- corrected images and characterization of abdominal fat by proton spectroscopy: preliminary study ; *30th European Society Congress of Magnetic Resonance in Medicine and Biology* ; Toulouse (France) ; 3-5 octobre 2013.

Faraz K, Ratiney H, Seyssel K, Valette PJ, Laville M, Beuf O ; Quantifications issues de l'imagerie multiparamétrique et de la spectroscopie de résonance magnétique pour l'étude des graisses abdominales dans un protocole de surnutrition ; *Atelier Biomarqueurs d'Imagerie du métabolisme et du risque cardiovasculaire* ; Bron (France) ; 18 et 19 Novembre 2014.

Julien B, Seyssel K, Feugier N, Lambert-Porcheron S, Draï J, Laville M, Disse E ; Impact of high plasma acyl ghrelin level on eating behaviour in obese women ; *21th European Congress on Obesity* ; Prague (République tchèque) ; 6-9 mai 2015.

Mathieu ME, Simon C, Seyssel K, Laville M ; Profil d'activité spontanée en contexte de suralimentation prolongée – Analyse exploratoire par l'accélérométrie ; *13^{èmes} Journées Francophones de Nutrition* ; Marseille (France) ; 9-11 décembre 2015.

- **Prix et bourses**

Bourse de voyage de 500€ de l'AFERO pour communication affichée à l'ECO :

Seyssel K, Alliot X, Graepi Dulac J, Nazare JA, Laville M, Disse E ; The ghrelin peak is a consequence rather than a cause of meal initiation in human ; *20th European Congress on Obesity*, Liverpool (Angleterre) ; 12-15 mai 2013.

Prix de 500€ de l'AFERO pour communication affichée :

Seyssel K, Alliot X, Graepi Dulac J, Nazare JA, Laville M, Disse E ; Le pic de ghréline: cause ou conséquence de l'initiation du repas chez l'Homme ? ; *30^{èmes} Congrès de l'Association Française d'Etudes et de Recherches sur l'Obésité* ; Dijon (France) ; 16 et 17 janvier 2014.

Prix de 400€ de l'EDISS pour communication orale :

Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, Loizon E, Chanseume E, Cantos C, Disse E, Lambert-Porcheron S, Brozek J, Blond E, Rieusset J, Morio B, Laville M, Vidal H ; La régulation du métabolisme énergétique dans le muscle squelettique au cours d'une surnutrition hyperlipidique chez l'homme sain ; *19^{ème} Journée Scientifique de l'EDISS* ; Villeurbanne (France) ; 16 octobre 2014.

Chapitre 1 : Contexte bibliographique



1. L'obésité et le surpoids

L'obésité est une maladie multifactorielle complexe combinant à la fois des facteurs génétiques encore mal identifiés et des facteurs environnementaux principalement liés à l'alimentation et à la sédentarité (Bouchard 1991). Son établissement, caractérisé par une phase précoce de prise de poids aboutissant à un excès de tissu adipeux, est la conséquence d'un déséquilibre de la balance énergétique entre les apports alimentaires et les dépenses énergétiques (Guyenet and Schwartz 2012; Swinburn and Ravussin 1993). La surcharge pondérale et l'obésité constituent un important défi de santé publique car elles prédisposent au développement de pathologies telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires et même certains cancers (Azagury and Lautz 2011; King *et al.* 1998).

1.1 L'obésité et le surpoids en chiffres

Depuis ces 50 dernières années, la prévalence du surpoids et de l'obésité n'a cessé d'augmenter à travers le monde. Une étude parue en 2011 dans le célèbre journal « Lancet » révélait qu'environ 1.46 milliard d'adultes étaient en surcharge pondérale à travers le monde et que l'obésité touchait environ 600 millions de personnes (Finucane *et al.* 2011). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a d'ailleurs revu ce chiffre à la hausse et estime qu'il y a, à l'heure actuelle, 1.9 milliard d'adultes en surcharge pondérale. Face à de telles constatations, l'OMS a déclaré que l'obésité était la première maladie épidémique non infectieuse de l'Histoire Humaine. Récemment, un cabinet de conseil (cabinet McKinsey) s'est penché sur la question du coût de l'obésité à travers le monde et estime que l'obésité coûte près de 2000 milliards de dollars par an. Même si ce chiffre est à relativiser du fait d'une méthodologie inconnue, il met l'accent sur un coût sociétal élevé de l'obésité.

En France, les différentes enquêtes épidémiologiques INSEE et Obepi démontrent clairement que l'obésité ne cesse de gagner du terrain au fil du temps (figure 1). En effet, la proportion d'adultes français obèses a été multipliée par 2.5 en un peu plus de 30 ans, passant de 6.1% en 1980 à 15% en 2012. De plus, en cumulant le surpoids et l'obésité, il apparaît qu'un adulte sur deux est en surpoids ou obèse (figure 2).

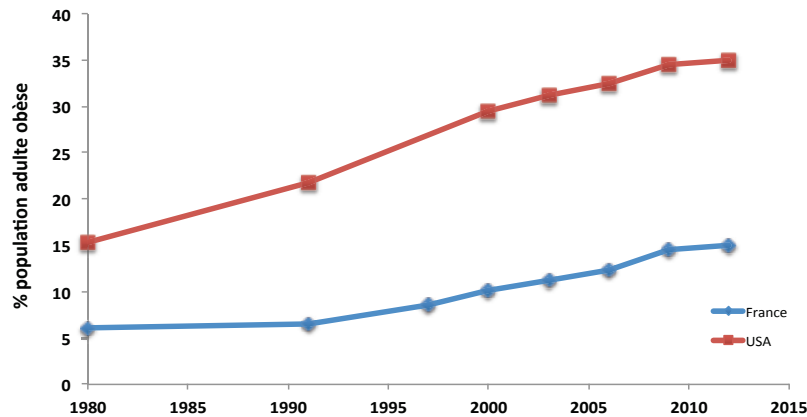


Figure 1 : Evolution de la prévalence adulte de l'obésité en France (d'après les enquêtes INSEE et Obepi) et aux Etats-Unis (d'après les enquêtes NHANES)

En se penchant sur le cas des Etats-Unis, qui est l'un des pays ayant la plus forte prévalence d'obésité au monde, on note là aussi que depuis les années 80 le pourcentage d'individus obèses n'a cessé de s'accroître et a été multiplié par 2, passant de 15.3% en 1980 à 34.9% en 2012. Les estimations futures sont aussi très alarmantes. En effet, d'après une équipe de chercheurs, le pourcentage d'obésité chez l'adulte atteindra les 42% aux Etats-Unis en 2050 (Hill *et al.* 2010).

Pour finir, il est important de noter que la surcharge pondérale apparaît malheureusement de plus en plus précocement chez l'enfant et qu'elle affecte aujourd'hui environ 42 millions d'enfants de moins de 5 ans à travers le monde (OMS).

1.2 Définition de l'obésité et du surpoids

Le surpoids et l'obésité se définissent selon l'OMS « comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle pouvant nuire à la santé ».

L'Indice de Masse Corporelle (IMC) est utilisé pour diagnostiquer le surpoids et l'obésité. Cet indice, inventé par Adolphe Quetlet, permet de phénotyper une personne en fonction de son poids et de sa taille (poids (kg)/taille² (m)). On parle de surpoids pour un IMC compris entre 25 et 29.9 kg/m² et d'obésité pour un IMC supérieur ou égale à 30 kg/m². On distingue généralement trois types d'obésité (figure 2):

- l'obésité modérée ou encore de type I (IMC compris entre 30 et 34.9 kg/m²)
- l'obésité dite sévère ou de type II (IMC entre 35 et 39.9 kg/m²)
- l'obésité morbide ou de type III (IMC supérieur à 40 kg/m²)

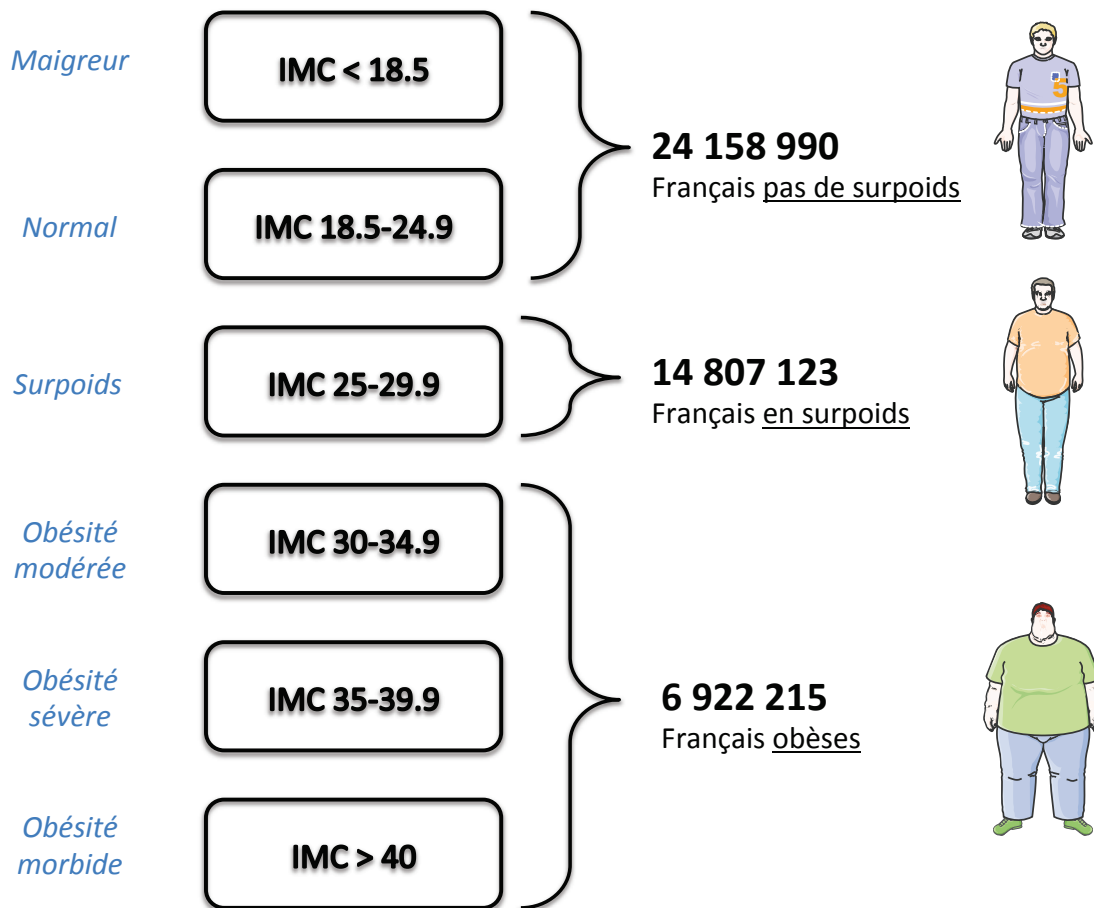


Figure 2 : La répartition de la population française en fonction de l'IMC d'après l'enquête Obepi 2012

Il est important de toujours garder à l'esprit que l'IMC ne nous donne qu'une approximation du degré d'adiposité d'un individu adulte. Il n'est pertinent que pour la population générale et il ne s'applique par exemple pas aux sportifs de haut niveau. En effet, il ne prend pas en compte les différentes composantes du poids que sont la masse maigre, la masse grasse et la masse osseuse, c'est pourquoi l'IMC doit toujours être associé avec la mesure du tour de taille et du tour de hanche pour être un bon indicateur de l'excès de tissu adipeux d'une personne. A titre d'exemple, le rugbyman Sébastien Chabal est « obèse » puisqu'il a un IMC de 31.5 kg/m². Néanmoins avec seulement 8% de masse grasse, il est loin d'avoir un excès de tissu adipeux.

Au delà de l'IMC, c'est la répartition du tissu adipeux qui est l'élément clé permettant d'évaluer correctement les facteurs de risque cardio-métabolique associés à l'obésité et au surpoids. En effet, les travaux de Jean Vague avaient déjà révélé en 1956 que l'accumulation de tissu adipeux dans la partie haute du corps était plus délétère que l'accumulation de tissu

adipeux dans la partie basse du corps (Vague 1956). On parle ainsi d'obésité androïde (corps en forme de pomme) et d'obésité gynoïde (corps en forme de poire). Grâce à l'essor de nouvelles techniques d'imagerie (scanner et imagerie par résonance magnétique (IRM)), des chercheurs ont caractérisé plus précisément que c'est l'accumulation de tissu adipeux viscéral qui est la plus néfaste pour l'organisme, puisqu'à adiposité équivalente ce sont les individus ayant une accumulation viscérale de tissu adipeux qui présentent les complications métaboliques les plus sévères contrairement aux individus ayant une accumulation sous-cutanée de tissu adipeux (Després 2006a ; Després 2006b; Després and Lemieux 2006). Il est maintenant bien établi que l'obésité centrale caractérisée par une accumulation de tissu adipeux viscéral est l'élément majeur et déterminant dans l'évaluation des facteurs de risque cardio-métabolique. De plus, l'existence d'individus obèses métaboliquement sains (c'est-à-dire ne présentant aucune pathologie cardio-métabolique) avec une adiposité principalement sous-cutanée renforce l'idée qu'au delà d'un excès de masse grasse c'est sa répartition qui prédétermine sa dangerosité (Blüher 2010; Fabbrini *et al.* 2015). De plus, l'accumulation de tissu adipeux viscéral, de par sa localisation dans le péritoine et sa circulation sanguine desservant le foie (Björntorp 1990), est sans nul doute un acteur majeur prédisposant à l'apparition de troubles cardio-métaboliques tels que l'insulino-résistance, la dyslipidémie, le diabète de type 2 ou encore les accidents cardiovasculaires.

En pratique clinique, la définition du « syndrome métabolique » est couramment utilisée et permet d'établir plus finement la prédisposition de la surcharge pondérale à l'apparition de troubles cardio-métaboliques (Miranda *et al.* 2005). Le diagnostic du syndrome métabolique repose sur l'évaluation de 5 critères présentés ci-dessous.

Table 1 : Paramètres considérés pour diagnostiquer le syndrome métabolique

| Paramètres | Homme | Femme |
|------------------------|----------------|----------------|
| Tour de taille | ≥ 94cm | ≥ 80cm |
| Glycémie à jeun | ≥ 1g/L | ≥ 1g/L |
| Triglycéridémie à jeun | ≥ 1.5g/L | ≥ 1.5g/L |
| Cholesterol HDL à jeun | ≤ 0.4g/L | ≤ 0.5g/L |
| Pression artérielle | ≥ 130/85 mm Hg | ≥ 130/85 mm Hg |

Même s'il existe différentes classifications pour établir le syndrome métabolique (OMS 1999, NCEP ATP III 2001, EGIR 2002 et IDF 2005), la prise en compte du tour de taille est indispensable afin d'évaluer la répartition du tissu adipeux et la notion d'accumulation

de tissu adipeux viscéral. Le consensus de la Fédération Internationale du Diabète (IDF) définit ainsi le syndrome métabolique comme une obésité centrale (tour de taille ≥ 94 cm pour les hommes et ≥ 80 cm pour les femmes) associée, a minima, à deux autres facteurs de risque. Bien entendu, la prise d'un traitement hypolipémiant, hypotenseur ou hypoglycémiant sera considérée comme un facteur de risque.

L'évolution croissante de la prévalence de l'obésité, associée à un coût sociétal très important démontre la nécessité urgente de développer des stratégies pour contrecarrer son évolution et ses complications. Une prévention et une prise en charge efficace de l'obésité restent prioritaires pour les pouvoirs publics.

1.3 Les causes de la surcharge pondérale

1.3.1 *Une balance énergétique positive*

La prise de poids aboutissant à l'obésité est due à une inadéquation des apports alimentaires aux regards des dépenses énergétiques totales de l'individu (Swinburn and Ravussin 1993; Spiegelman and Flier 2001). On parle alors de balance énergétique positive. L'excès calorique ingéré, s'il est prolongé, induit une prise de poids quel que soit le patrimoine génétique de l'individu. En revanche, cela n'exclut pas des différences de prises de poids en fonction de celui-ci.

Nous allons maintenant définir succinctement les différentes composantes de la balance énergétique et nous développerons par la suite les différents facteurs influençant celle-ci et contribuant au développement de l'obésité. La balance énergétique représente ainsi l'état d'équilibre entre les « entrées », autrement dit les apports caloriques, et les « sorties » c'est à dire les dépenses énergétiques de l'individu. La figure 3 illustre l'évolution du poids en fonction de l'équilibre de la balance énergétique. Ainsi le **poids** est :

- **stable** lorsque les **apports** sont **équivalents** aux **dépenses**,
- **diminué** lorsque les **apports** sont **inférieurs** aux **dépenses**,
- **augmenté** lorsque les **apports** sont **supérieurs** aux **dépenses**.

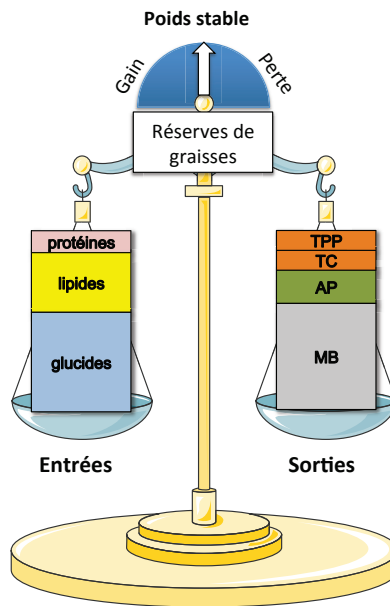


Figure 3 : La balance énergétique à l'état d'équilibre (MB : métabolisme de base, TPP : thermogénèse post-prandiale, TC : thermorégulation corporelle, AP : activité physique)

a) Les « entrées »

Les **apports énergétiques alimentaires** représentent toutes les calories (sous forme d'aliments ou de boissons) ingérées au cours d'une journée. Dans le bol alimentaire, les macronutriments, fournissant l'énergie à l'organisme, se présentent sous quatre formes différentes ayant des densités énergétiques différentes, les lipides (9kcal/g), les glucides (4kcal/g), les protéines (4kcal/g) et l'alcool (7kcal/g). Nous reviendrons, par la suite, sur les différents effets d'une surconsommation de certains d'entre eux.

b) Les « sorties »

La figure 3 illustre les quatre composantes de la **dépense énergétique totale**, à savoir le métabolisme de base, la thermogénèse post-prandiale, la thermorégulation corporelle et l'activité physique.

Le **métabolisme de base**, représentant environ 65% de la dépense énergétique totale, correspond à la dépense d'énergie irréductible nécessaire afin d'assurer les fonctions vitales de l'organisme comme l'entretien des gradients électrochimiques et le fonctionnement des grandes fonctions de l'organisme (respiration, circulation sanguine, excrétion). En règle générale, chez l'Homme, le métabolisme de base se mesure le matin,

après 12 heures de jeûne, en position allongée, en condition de thermoneutralité sans activité intellectuelle importante (Laville 2006).

La **thermogénèse post-prandiale** ou thermogénèse induite par l'alimentation correspond à l'énergie dépensée par l'organisme pour digérer, transporter, métaboliser et stocker l'énergie provenant des aliments. Cette thermogénèse est fonction de la quantité et de la qualité des macronutriments ingérés et ne s'observe, comme son nom l'indique, qu'en période postprandiale. A la suite d'un repas standard, la thermogénèse postprandiale ne dure que quelques heures (\approx 4 heures). Elle représente entre 10 et 15% de la dépense énergétique totale (Rigaud and Melchior 1992).

La **thermorégulation** représente la dépense d'énergie liée à la régulation de la température corporelle permettant de maintenir une température du corps à 37°C. Cette dépense d'énergie est bien entendu dépendante des conditions climatiques de l'environnement. Elle regroupe aussi bien les dépenses d'énergie pour lutter contre le froid (frissonnement et thermogénèse du tissu adipeux brun) mais aussi pour lutter contre le chaud (sudation).

L'**activité physique** correspond à la dépense énergétique liée à toute activité musculaire en plus du métabolisme de base. Elle représente en moyenne 15 à 30% de la dépense énergétique totale. Néanmoins, elle est très variable d'un individu à l'autre et peut facilement doubler avec un comportement actif comparativement à une conduite sédentaire. Le muscle squelettique est ainsi un acteur fort de la consommation en énergie de l'organisme. Ceci explique que le Programme National Nutrition Santé de lutte contre la prise de poids et l'obésité fasse campagne avec le slogan « Pour votre santé, pratiquez une activité physique régulière ».

Même si la prise de poids, aboutissant à l'obésité, est due à problème simple de balance énergétique positive, l'environnement, le contexte socio-professionnel, le style de vie, l'alimentation, tout comme le patrimoine génétique sont autant de facteurs influençant le développement de l'obésité (Astrup 1999; Maffei 1999). Tous ces paramètres sont souvent partagés au sein d'une même famille et il est d'ailleurs intéressant de noter que 70% des individus obèses possèdent au moins un parent obèse (Beales 2010).

Deux composantes de la balance énergétique sont essentiellement dues aux comportements et habitudes de vie de l'individu, à savoir l'alimentation et l'activité

physique. Néanmoins, l'Homme évolue maintenant dans un environnement pouvant être qualifié « d'obésogène » ayant à sa portée une alimentation riche en énergie et la possibilité de diminuer ses dépenses énergétiques de manière drastique.

1.3.2 Des prédispositions génétiques

a) Les quelques rares cas d'obésité monogénique

Bien qu'il existe des cas d'obésité monogénique, ceux-ci restent minoritaires face au nombre d'individus obèses (Dubern and Clement 2012). On peut citer par exemple les obésités liées aux mutations du gène de la leptine (Montague *et al.* 1997) ou de son récepteur (Clément *et al.* 1998) ou encore les obésités liées aux mutations du récepteur MC4R (récepteurs des mélanocortines de type 4) (Farooqi *et al.* 2003; Yeo *et al.* 2003). Ces mutations induisent toutes une hyperphagie sévère chez les patients atteints, dès la petite enfance. Néanmoins, il est très important de toujours garder à l'esprit que le patrimoine génétique d'un individu ne fait que le prédisposer à développer cette pathologie dans un environnement déterminé. Par exemple, si l'environnement est pauvre en calories, c'est à dire que l'apport alimentaire est insuffisant pour couvrir les besoins, alors même des individus ayant une obésité monogénique ne développeront très certainement pas d'obésité.

b) Un patrimoine génétique économe

L'Homme possède un patrimoine génétique qui est le fruit de millions d'années d'évolution et dispose ainsi d'un équipement métabolique très performant lui permettant d'alterner entre périodes de jeûne et périodes nourries.

Il est impressionnant de voir à quel point le corps humain peut s'adapter à divers types d'alimentation et à différents apports caloriques. A titre d'exemple, le photographe Peter Menzel a publié dans un ouvrage nommé « Hungry Planet: What the World Eats » des photographies de familles aux quatre coins du monde avec tous les aliments consommés en une semaine, comme l'illustre la figure 4. Même si cet exemple ne repose pas sur des données quantitatives précises, il illustre comment le corps humain peut s'adapter, dans une certaine mesure, à un apport calorique très différent.



Figure 4 : Illustration de l'adaptabilité du corps humain à l'apport calorique

Durant toute son évolution, l'Homme et ses prédécesseurs ancestraux ont évolué dans un environnement assez pauvre en énergie (Keys *et al.* 1950; McCance 1975; Elia 2000). De plus, jusqu'à une période récente, les populations à travers le monde étaient soumises, de manière très fréquente, à des périodes de forte restriction calorique (famine de 1693-1694 en France, famine de la pomme de terre de 1845-1851 en Irlande, famine de 1891 en Russie, famine de 1899 au Kenya centra, etc.). Ces famines, assez récentes dans l'Histoire humaine, ne sont que le reflet des famines passées auxquelles était confronté l'Homme (Speakman 2006). James V Neel fut ainsi le premier à proposer le concept de gène de « survie » que l'on pourrait aussi nommer gène « économe » (Neel 1962). Il proposa que cette pression environnementale ait ainsi sélectionné les individus possédant un patrimoine génétique économe, c'est-à-dire les individus possédant un métabolisme avec un rendement élevé de production d'énergie à partir de nutriments absorbés et une forte capacité à stocker les excédents. Ces mêmes gènes, appelés à fonctionner de nos jours, c'est-à-dire dans un environnement d'abondance alimentaire, pourraient expliquer la flambée de maladies métaboliques comme l'obésité (Neel 1962). De plus, cette hypothèse semble être renforcée par le fait que la prévalence de maladies métaboliques, comme le diabète et

l'obésité, est encore plus importante dans certaines populations comme les indiens Pimas qui sont passés brutalement d'un mode de vie « chasseur-cueilleur » au mode de vie occidentale (Knowler *et al.* 1991).

1.3.3 L'évolution des modes de vie

a) Du chasseur-cueilleur à l'industrie agro-alimentaire

La manière de s'alimenter a, elle aussi, beaucoup évolué au cours de l'histoire de l'Homme. L'espèce humaine était, il a bien longtemps, contrainte de chasser, de cueillir, de charogner, de ramasser, de déterrer pour pouvoir se nourrir afin d'assurer sa survie. Espèce opportuniste, l'Homme préhistorique ne devait pas être exigeant pour se nourrir et il devait savoir saisir toutes les opportunités se présentant à lui. Passant toute ou partie de sa journée en quête de nourriture, il évoluait dans un environnement assez pauvre en nourriture et dépensait beaucoup d'énergie afin de la trouver (Keys *et al.* 1950; McCance 1975; Elia 2000). Au fil du temps, l'Homme a commencé à cultiver les champs, à élever du bétail lui permettant de s'assurer un apport calorique régulier tout en fournissant moins d'effort. L'avènement des machines a permis à l'Homme de continuer sur cette voie, en augmentant la production de nourriture tout en réduisant l'énergie nécessaire à sa fabrication. De façon schématique, nous sommes passés d'une alimentation aléatoire de « chasseur-cueilleur », caractérisée par des aliments à faibles densités énergétiques associés à un environnement pauvre en calories, à une alimentation standardisée de l'industrie agro-alimentaire caractérisée par des aliments à haute densité énergétique associés à un environnement permettant la consommation à outrance.

Ces changements drastiques des modes de vie ont eu deux conséquences majeures, premièrement cela a entraîné la disparition totale de la dépense d'énergie liée à l'activité physique afin de s'alimenter (chasser, cueillir, etc.) et deuxièmement, cela a eu un fort impact sur le comportement alimentaire permettant une surconsommation. En effet, de nos jours, la nourriture est omniprésente, partout autour de nous, et nous pouvons désormais nous permettre de manger quasiment n'importe quand, le tout, sans fournir le moindre effort, si ce n'est ouvrir la porte d'un placard, la porte de notre réfrigérateur ou encore commander de la nourriture livrée sur notre palier de porte. Il est ainsi très facile de consommer des produits alimentaires et de consommer trop de calories. De plus, le

marketing et les slogans publicitaires font maintenant partie de notre quotidien et véhiculent, à travers les médias, des messages nous incitant à manger.

La nourriture et les aliments, eux-mêmes, ont évolué au fil du temps. Plus l'Homme gagnait en maîtrise de son art, plus les aliments ont été raffinés, décortiqués, extrudés, concentrés, dénaturés, etc. L'art culinaire n'a cessé de se peaufiner jusqu'à atteindre aujourd'hui son paroxysme en maîtrise et connaissance pour le plus grand plaisir de nos papilles. Néanmoins, nos assiettes aussi ont beaucoup changé ces dernières décennies, l'industrie agroalimentaire s'est emparée de nos cuisines laissant pour compte le travail manuel de sélection des produits, de préparation, de cuisson, d'assemblage à la simple tâche de réchauffage. On voit ainsi aujourd'hui apparaître des plats de nos grands-mères dans les rayons d'hypermarchés avec une recette incorporant les mêmes produits que la recette de notre enfance, mais contenant aussi certains conservateurs, exhausteurs de goût, émulsifiants et autres E000. Nous ne prenons plus la peine de faire à manger par manque de temps et nous nous rabattons sur des plats rapides à consommer et rapides à préparer. De plus, pour le grand public il n'est pas aisé de comprendre une étiquette nutritionnelle d'un aliment industriel et de savoir comment le positionner dans une alimentation équilibrée. Le slogan défendu par les autorités : « Pour votre santé, mangez au moins cinq fruits et légumes par jour » a le mérite d'être simple et de prôner une alimentation naturelle.

b) Les apports alimentaires

- **La répartition journalière de l'alimentation**

Les apports alimentaires sont généralement répartis sur la journée en deux, trois ou quatre repas par jour, à heures fixes. Le nombre de repas par jour, dans un contexte de déstructuration des repas (Bertéus Forslund *et al.* 2005; Samuelson 2000), peut légitimement être suspecté d'avoir un rôle dans l'obésité. Néanmoins les données épidémiologiques à ce sujet ne nous permettent pas de trancher sur cette question, certaines études rapportent une relation inverse entre la fréquence des repas et l'IMC (Fabry *et al.* 1964; Ma *et al.* 2003), d'autres ne trouvent aucun lien (Kant *et al.* 1995; Berg *et al.* 2009) et au contraire certaines retrouvent une relation positive (Howarth *et al.* 2007; Marín-Guerrero *et al.* 2008).

Récemment, nous avons réalisé une étude en cross-over visant à étudier l'impact du fractionnement alimentaire chez des individus minces (Allirot *et al.* 2013; Annexe 9) et

obèses (Allirot *et al.* 2014; Annexe 10). Ce protocole a été dupliqué dans deux lieux différents pour permettre d'un côté une exploration métabolique (CRNH-RA) et d'un autre côté une exploration comportementale (Centre de recherche de l'institut Paul Bocuse : CRIPB). En effet, pour pouvoir démontrer un potentiel bénéfique du fractionnement alimentaire, il est nécessaire de prendre en compte de nombreux paramètres comme la faim, la satiété, le comportement alimentaire, la thermogénèse postprandiale, l'oxydation des nutriments et les concentrations en hormones et métabolites qui ne peuvent souvent pas être évalués au même endroit.

Pour mimer le fractionnement alimentaire, c'est à dire l'augmentation de la fréquence des repas, nous avons soumis des sujets à la consommation d'un petit déjeuner de 674kcal en une prise à 8h (condition témoin), et lors d'une autre journée, à la consommation d'un quart du petit déjeuner (soit 167kcal) à 8h, 9h, 10h et 11h (condition fractionnée). Tous les sujets ont donc été soumis à ces deux conditions au CRNH-RA et au CRIPB. A midi, durant l'exploration métabolique au CRNH-RA, les sujets ont reçu un repas standardisé et durant l'exploration comportementale au CRIPB les sujets ont été exposés à un buffet *ad libitum* qui a été préalablement validé comme outil (Allirot *et al.* 2012). Le buffet *ad libitum* est composé de différents aliments nous permettant de juger de l'impact du fractionnement sur le comportement alimentaire et sur l'apport calorique dans sa globalité. Nous avons ainsi démontré, de façon aigüe, que le fractionnement alimentaire induisait une modification positive du comportement alimentaire au buffet *ad libitum* des sujets minces avec une diminution de la consommation en lipides et une tendance de diminution de la consommation énergétique totale. A l'inverse, le fractionnement alimentaire induit des modifications métaboliques négatives comme une diminution de la thermogénèse post-prandiale associée à une inhibition de la lipolyse (reflétée par la concentration sanguine en acides gras libres). Même s'il semble que le fractionnement alimentaire puisse être, de façon aigüe, une stratégie pour diminuer les apports caloriques chez les sujets minces, les effets à long terme sur la perte du jeûne inter-prandial (glycémie et insulinémie ne revenant jamais à une valeur basale) et l'inhibition constante de la lipolyse pourraient avoir des effets négatifs (Solomon *et al.* 2008; Munsters and Saris 2012).

Chez les sujets obèses, le fractionnement alimentaire a contribué aux mêmes effets satiétogènes, métaboliques et hormonaux que chez les sujets minces. En revanche,

contrairement aux sujets minces qui ont diminué de façon spontanée leur consommation de lipides et ont eu tendance à diminuer leurs apports caloriques au buffet *ad libitum*, le fractionnement alimentaire n'a pas modifié l'apport calorique ou l'apport lipidique chez les sujets obèses. Chez ces sujets, nous avons observé un changement de comportements alimentaires, caractérisé par une baisse de la consommation des aliments à faible densité énergétique du buffet. Il semble donc que le fractionnement alimentaire ne soit pas une stratégie pour des sujets obèses afin de perdre du poids.

Pour conclure, même si la littérature scientifique actuelle reste encore mitigée à l'égard de l'efficacité du fractionnement alimentaire, de nouvelles études à moyen/long terme sont nécessaires pour étudier son impact sur le contrôle du poids corporel. Ces études devront porter une attention toute particulière à la consommation calorique spontanée des individus et aussi étudier les altérations métaboliques que peut entraîner le fractionnement alimentaire comme la perte du jeûne inter-prandial, l'inhibition constante de la lipolyse et le déséquilibre de la balance oxydation glucidique/lipidique. Enfin, s'il s'avérait que le fractionnement alimentaire isocalorique soit une stratégie pour perdre du poids, il faudrait être très clair avec le grand public et établir un message simple. En effet, le plus gros risque de dérive d'un tel message serait le phénomène de snacking, qui induit le plus souvent un choix d'aliment à haute densité énergétique et induit aussi malheureusement une augmentation de l'apport calorique total (Bellisle 2014).

- **Les lipides : quantité et qualité**

Comme expliqué précédemment, les apports alimentaires représentent toutes les calories ingérées au cours d'une journée que ce soit sous forme liquide ou sous forme solide. Les apports alimentaires sont fonction des besoins énergétiques de chaque individu et ceux-ci varient au cours de la vie en fonction de l'âge, du sexe et des dépenses énergétiques.

En moyenne, un homme adulte a besoin d'un apport alimentaire moyen de 2700 kcal/j afin de couvrir ses besoins journaliers et une femme adulte a besoin en moyenne de 2200 kcal/j. D'après l'ouvrage d'Ambroise Martin nommé « Apports nutritionnels conseillés pour la population française » (étant la référence dans le monde de la diététique), l'apport énergétique journalier doit être composé de :

- **10-15% de protéines** (dont la moitié d'origine végétale et l'autre moitié d'origine animale)
- **35-40% de lipides** (dont la moitié d'origine végétale et l'autre moitié d'origine animale et 1/3

d'acides gras mono-insaturés, 1/3 d'acides gras poly-insaturés et 1/3 d'acides gras saturés)

- 45-50% de glucides (*dont maximum 25% sous forme de glucides simples*)

En respectant cette répartition macronutritionnelle associée à une alimentation diversifiée riche en fruits et légumes, une alimentation équilibrée permet de maintenir un poids stable et de couvrir tous les besoins d'un individu. Les apports en micronutriments sont eux aussi couverts, évitant ainsi le développement de pathologies telles que la cécité (carence en vitamine A), le crétinisme (carence en iode) ou encore le scorbut (carence en vitamine C).

Dans le contexte actuel d'une obésité croissante, il est nécessaire de bien comprendre comment le déséquilibre en macronutriments affecte le développement de l'obésité. Dans la littérature scientifique, une question reste controversée, à savoir si le pourcentage de graisses alimentaires joue un rôle important dans l'augmentation de la prévalence de la surcharge pondérale. Cependant, différentes études prospectives de cohortes montrent qu'il n'existe pas de lien entre le pourcentage de lipides dans l'alimentation et l'évolution du poids corporel (Klesges *et al.* 1992; Kant *et al.* 1995; Ma *et al.* 2003), à l'inverse d'autres démontrent une association positive (Coakley *et al.* 1998; Mosca *et al.* 2004). N'oublions pas qu'au delà du pourcentage de lipides consommés, c'est le bilan énergétique qui prévaut dans la genèse de l'obésité. Les effets, potentiellement délétères, des lipides sur le poids corporel doivent être vus à travers leurs effets sur l'apport énergétique total.

En 1987, Lissner *et al.* ont démontré que plus une alimentation est enrichie en lipides, plus l'apport calorique augmente de façon spontanée (Lissner *et al.* 1987). Dans cette étude, 24 femmes ont été exposées matin, midi et soir, durant 14 jours, à trois types de régime *ad libitum*, composés en apparence des mêmes aliments et plats, mais avec différents enrichissements en lipides (faible : 15-20%, moyen : 30-35% et élevé : 45-50%). Comme illustré dans la figure 5 ci-dessous, de manière spontanée, le régime pauvre en lipides induit chez ces femmes une diminution de l'apport calorique total associée à une diminution du poids corporel tandis que le régime riche en lipides induit une « surconsommation passive » de calories associée à un gain de poids comparativement au régime moyennement enrichi (figure 5B).

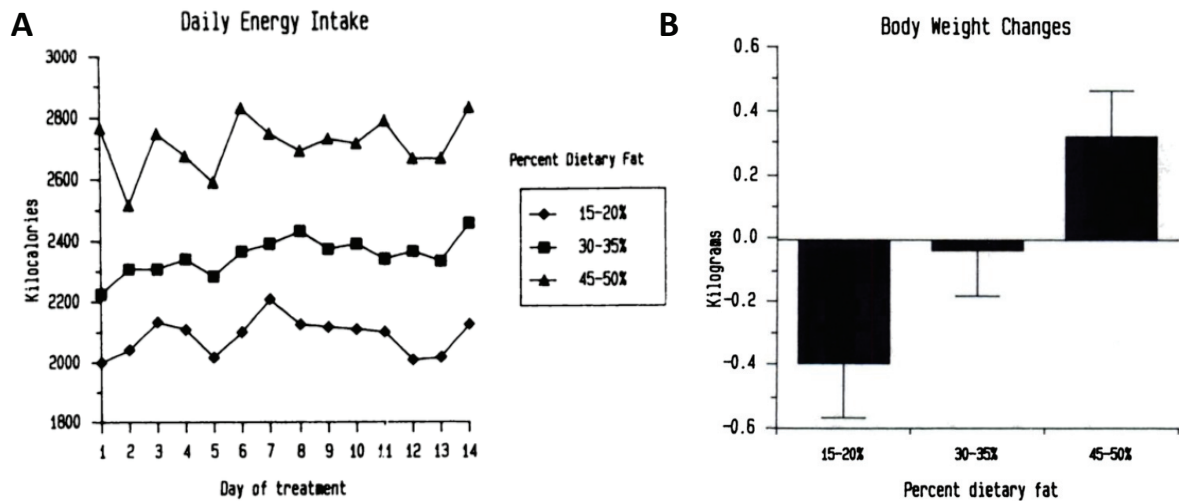


Figure 5 : Apports caloriques journaliers moyens (A) et évolution moyenne du poids corporel (B) en fonction du type d'enrichissement en lipides du régime (d'après Lissner *et al.* 1987)

Par la suite, Blundell *et al.* (1993) ont caractérisé le mécanisme d'action de ce phénomène et montré que les lipides induisent une surconsommation passive à cause d'un pouvoir satiétogène très limité. A l'aide de différentes expériences, ils ont montré chez des sujets minces et des sujets obèses que l'enrichissement en lipides ou en glucides d'un repas n'impacte pas de la même façon l'apport calorique au repas suivant (Blundell *et al.* 1993). Une de leurs expériences a été d'imposer à 16 sujets minces de consommer entièrement différents types de petit déjeuner « standardisé » (normal, enrichi en lipides ou enrichi en glucides) et à les exposer 90 minutes plus tard à un buffet *ad libitum*. Comme l'illustre la figure 6 ci-dessous, malgré un apport énergétique identique (803 kcal) entre le petit déjeuner riche en lipides et le petit déjeuner riche en glucides, l'exposition au buffet 90 minutes plus tard a entraîné un consommation plus importante de calories à la suite du petit déjeuner riche graisse.

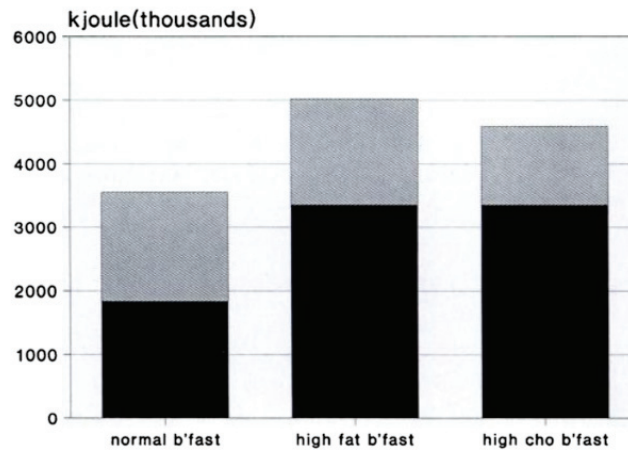


Figure 6 : Apports caloriques moyens après les trois types de petit déjeuner (normal, riche en lipides et riche en glucides). La partie noire de l'histogramme représente l'apport énergétique des différents petits déjeuners et la partie grise représente l'apport calorique au buffet *ad libitum* proposé 90 minutes plus tard (d'après Blundell *et al.* 1993)

Avec d'autres expériences que celle-ci, et notamment certaines réalisées chez des sujets obèses, les auteurs ont ainsi démontré l'incapacité des lipides à induire une satiété adéquate contribuant donc à une augmentation de l'apport calorique total de manière insidieuse (Blundell *et al.* 1993). Bray et Popkins suggèrent, eux aussi, que les lipides sont bel et bien à incriminer dans la genèse de l'obésité au travers de l'augmentation de l'apport calorique total qu'ils induisent (Bray and Popkin 1998). Les auteurs, en analysant 28 études cliniques, montrent d'une manière générale, que le fait de diminuer le pourcentage de lipides dans l'alimentation induit une diminution de l'apport calorique totale de 11 à 31%.

Il est intéressant de mettre en regard ces données et notre environnement actuel qui propose une offre variée d'aliments riches en lipides, surtout lorsque le repas est pris dans un « fast food » (restaurant rapide). Par ailleurs, une récente étude de cohorte portant sur 18 098 adultes américains de 2003 à 2010 révèle qu'il existe de manière significative, une association positive entre la consommation fréquente de « fast food » et l'augmentation de l'apport caloriques (+190kcal), de lipides (10.6g) et d'acides gras saturés (3.5g) (An 2015). L'augmentation de la part de lipides dans l'alimentation, associée à l'utilisation de plus en plus fréquente de lipides, dans certains produits industriels renforce très certainement l'épidémie d'obésité (Blundell *et al.* 1996). En France, l'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation) nous apprend d'ailleurs que 43% des adultes et 34% des enfants

ont une part trop importante de lipides dans leur alimentation avec un pourcentage dépassant la fourchette haute des 40% recommandés.

Après avoir discuté de l'impact de la quantité de lipides dans la genèse de l'obésité, intéressons-nous maintenant aux aspects qualitatifs des lipides. La majorité des lipides de notre alimentation (~95%) se trouve sous forme de triglycérides (TG). Une molécule de triglycérides est composée d'une molécule de glycérol sur laquelle est fixée trois molécules d'acides gras. Les acides gras peuvent être classés sur deux critères, en fonction du nombre d'atomes de carbones (longueur de la chaîne carbonée) et en fonction du nombre de doubles liaisons (degré de saturation). On distingue ainsi généralement les acides gras à chaîne courte (AGCC : C4 à C6), les acides gras à chaîne moyenne (AGCM : C8 à C14) et les acides gras à chaîne longue (AGCL : C16 et plus). On distingue également les acides gras saturés (AGS : aucune double liaison), mono-insaturés (AGMI : une double liaison) et poly-insaturés (AGPI : deux double liaison ou plus).

Bien que de nombreuses études de cohortes ne trouvent pas de lien entre l'apport en acides gras saturés et le changement de poids (Colditz *et al.* 1990; Ludwig *et al.* 1999) ou l'apparition de troubles cardiovasculaires (Siri-Tarino *et al.* 2010), les acides gras saturés sont probablement impliqués dans le développement de l'obésité. En effet, dans une autre étude, Casas-Agustench *et al.* ont montré que le degré de saturation des lipides d'un repas modifie la thermogénèse postprandiale (Casas-Agustench *et al.* 2009). Les résultats de cette étude montrent qu'un repas riche en AGS induit une plus faible thermogénèse postprandiale qu'un repas riche en AGPI ou AGMI. Dans une autre étude, Piers *et al.* ont eux aussi montré une diminution de la thermogénèse postprandiale liée à la consommation d'un repas riche en AGS, comparativement à un repas riche en AGMI (Piers *et al.* 2002). Dans cette même étude, les auteurs ont montré plus spécifiquement que la consommation d'un repas riche en AGS induit une diminution de l'oxydation lipidique.

Dans une autre étude (Kien *et al.* 2013), visant à déterminer l'impact à moyen terme (3 semaines) de la consommation d'un régime isocalorique riche en AGS (riche en acide palmitique), comparé à un régime isocalorique riche en AGMI (acide oléique), les auteurs ont mis en évidence que le régime riche en AGS diminue significativement l'activité physique (mesurée à l'aide d'un accéléromètre) des sujets minces et obèses. Comme l'illustre la figure 7 ci-dessous, il semble que la consommation d'un régime riche en AGS induit une diminution

spontanée de l'activité physique des individus. Dans une moindre mesure, ils ont aussi montré que le régime riche en AGS diminue le métabolisme de base associé à une diminution de la thermogénèse post-prandiale.

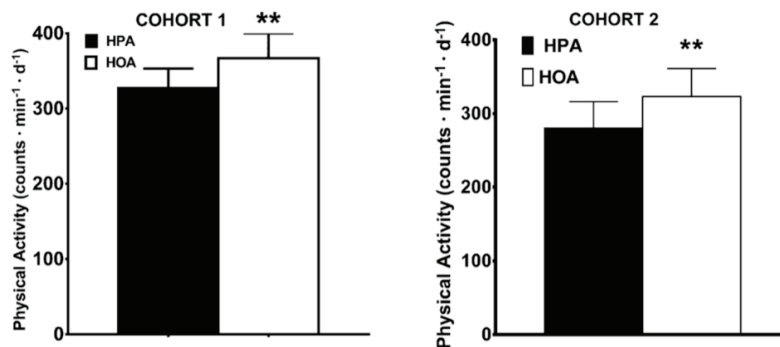


Figure 7 : Activité physique des sujets de la cohorte 1 et 2 en fonction du type de régime (HPA : régime riche en AGS ; HOA : régime riche en AGMI) (d'après Kien *et al.* 2013)

L'ensemble de ces résultats mettent en avant l'effet potentiellement délétère de la consommation trop importante d'AGS sur l'équilibre de la balance énergétique. La consommation d'acides gras saturés semble ainsi, à court terme, permettre l'épargne des lipides en modifiant les flux de substrats énergétiques de l'organisme (balance d'oxydation glucides/lipides). De plus, cet effet serait maintenu à moyen terme, en plus d'induire une baisse de l'activité physique spontanée.

- **Les produits laitiers : amis ou ennemis ?**

Les produits laitiers, issus de la production animale, sont naturellement riches en acides gras saturés. D'après la table CIQUAL, les différents type de fromages, de laits, de beurres, de yaourts contiennent tous une proportion d'environ 60-65% d'acides gras saturés (relativement à la quantité totale de lipides). Les produits laitiers, pourraient donc avoir un rôle délétère dans l'obésité de part leur proportion élevée en acides gras saturés.

Néanmoins différentes études montrent que la consommation de produits laitiers a un rôle protecteur sur la prévalence du syndrome métabolique (Ferrières *et al.* 2006; Kim 2013; Martins *et al.* 2015), de l'obésité viscérale (Kim 2013; Wang *et al.* 2014), du diabète (Choi *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006) et des maladies cardiovasculaires (Markey *et al.* 2014). De même, d'autres études épidémiologiques montrent, plus particulièrement, que c'est la

consommation de produits laitiers fermentés (Sluijs *et al.* 2012) et/ou de yaourts (O'Connor *et al.* 2014) qui est inversement corrélée avec le risque de développer un diabète de type 2.

Les produits laitiers, bien que vecteurs d'une grande quantité d'acides gras saturés, semblent donc jouer un rôle protecteur dans l'apparition des maladies cardio-métaboliques. Certains constituants même des produits laitiers, comme le calcium, la vitamine D (Pittas *et al.* 2007) ou encore le magnésium (Schulze *et al.* 2007) pourraient jouer un rôle protecteur. De même, certains acides gras saturés spécifiques des produits laitiers (Wolk *et al.* 1998; Smedman *et al.* 1999) comme l'acide pentanoïque (C15:0) ou encore l'acide heptadécanoïque (C17:0) pourraient jouer un rôle protecteur puisque leur concentration sanguine semble être inversement associée au développement du diabète de type 2 (Forouhi *et al.* 2014).

Ces acides gras à chaîne impaire proviennent presque exclusivement des produits laitiers et de la viande bovine. Il existe d'ailleurs une forte association entre la consommation de produits laitiers et les niveaux sanguins de ces deux acides gras à chaîne impaire. Nous avons récemment collaboré avec une équipe de chercheurs anglais, dirigée par le Dr. Koulman, afin de déterminer si une modification de l'apport en produits laitiers est capable de modifier les concentrations sanguines en C15:0 et C17:0 et ainsi démontrer le rôle de biomarqueur des acides gras C15:0 et C17:0. A l'aide de notre étude de surnutrition riche en produits laitiers, que nous développerons par la suite, nous avons démontré, avec cette équipe, que les niveaux en C15:0 augmentent de façon significative à la suite de 56 jours de surnutrition tandis que les niveaux sanguins en C17:0 ne varient pas. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que le niveau sanguin en C15:0 est un bon indicateur de la consommation de produits laitiers tandis que le niveau en C17:0 ne semble pas l'être.

- **Les glucides sont-ils réellement innocents ?**

Il n'existe pas d'arguments épidémiologiques clairs nous permettant d'incriminer les glucides dans la genèse de l'obésité. En effet, de nombreuses études de cohorte ne retrouvent pas d'association entre la quantité de glucides consommés et l'évolution du poids (Ma *et al.* 2003; Halkjaer *et al.* 2006). Néanmoins, les glucides jouent très probablement un rôle dans la genèse de l'obésité mais, une fois encore, les effets délétères des glucides doivent être vus à travers leurs effets sur l'apport énergétique total.

Il existe de nombreuses études mettant en évidence que la consommation de

glucides sous forme liquide induit un effet satiétogène très réduit et contribue ainsi à une surconsommation passive de calories (Hulshof *et al.* 1993; DiMiglio and Mattes 2000; Mattes 2006). En 1993, Hulshof *et al.* ont montré que l'effet satiétogène d'un apport calorique est fonction de son état physique, c'est-à-dire solide ou liquide. Ils ont ainsi démontré que la satiété générée par un même macronutriment est plus importante lorsqu'il est consommé sous forme solide que sous forme liquide. La mastication est d'ailleurs suggérée par les auteurs comme pouvant jouer un rôle. Dans une autre étude, les auteurs ont brillamment démontré que la consommation de glucides sous forme liquide induit une surconsommation passive de calories et une prise de poids à moyen terme (DiMiglio and Mattes 2000). Dans cette étude, réalisée en cross-over, les auteurs ont demandé à 7 hommes et 8 femmes de consommer soit du soda (450 kcal/j), soit des bonbons (450 kcal/j) durant 4 semaines. Comme illustré dans la figure 8 ci-dessous, la consommation de soda n'a pas impacté l'apport calorique total journalier tandis que la consommation de bonbon a diminué spontanément l'apport calorique journalier chez ces mêmes individus.

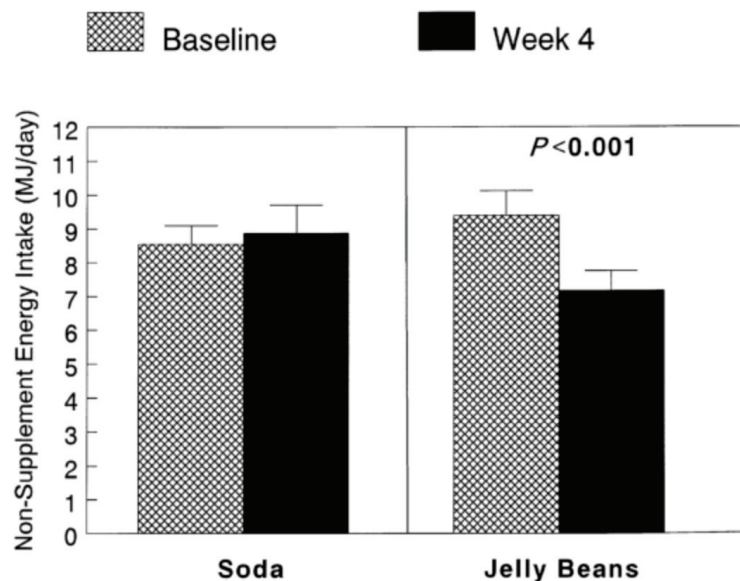


Figure 8 : Apports caloriques journaliers moyens avant (baseline) et après (week 4) la prise de soda et la prise de bonbons (jelly beans) (d'après DiMiglio and Mattes 2000). L'apport calorique total en noir ne prend pas en compte les +450kcal apportés par la consommation du soda ou des bonbons.

Cette compensation induite par l'apport solide, contrairement à l'apport liquide, témoigne du phénomène de surconsommation passive des glucides sous forme liquide. De

plus, il est intéressant de noter dans cette étude que la consommation de soda a induit une prise de poids significative tandis que la consommation de bonbons n'a pas affecté le poids corporel des individus. Rappelons, à ce titre, que la consommation moyenne de soda aux Etats-Unis est de 170 litres par an et par américain soit un apport de presque 500mL de soda par jour. La consommation accrue de sodas et de jus de fruits dans notre société est, sans nul doute, un facteur contribuant au développement de l'obésité de par une surconsommation passive de calories.

Les glucides de notre alimentation sont majoritairement apportés sous forme de glucides complexes comme l'amidon qui est une chaîne ramifiée de glucose. Les disaccharides, comme le saccharose et le lactose ou encore les glucides simples, comme le glucose et le fructose ne représentent normalement qu'un faible pourcentage des glucides consommés. Néanmoins, de nos jours l'industrie agro-alimentaire utilise, de plus en plus souvent, du fructose (fabriqué à partir de sirop de maïs) pour confectionner certains produits de pâtisserie par exemple, car le fructose possède un pouvoir sucrant plus élevé que le glucose. En effet, le glucose a un pouvoir sucrant d'environ 0.7 tandis que le fructose a un pouvoir sucrant de 1.3 à 1.5 (comparativement au saccharose). Aux Etats-Unis, l'utilisation, de plus en plus fréquente, de sirop à haute teneur en fructose pour les pâtisseries ou les sodas joue très certainement un rôle majeur dans l'épidémie d'obésité. En effet, il est bien démontré dans la littérature que le fructose induit des effets délétères spécifiques au niveau hépatique et contribue à la genèse des complications métaboliques de l'obésité (Tappy and Lê 2010). Qu'il soit consommé d'une manière isocalorique ou en plus de l'alimentation, il induit une augmentation du pourcentage de lipides dans le foie et dans le muscle (Faeh *et al.* 2005; Lê *et al.* 2009; Stanhope *et al.* 2009; Egli *et al.* 2013). Ces altérations, induites par le fructose, contribuent à modifier les flux de substrats dans l'organisme et participent à une accumulation de lipides accrue. Nous reparlerons plus en détails, dans ce manuscrit, des effets du fructose sur le muscle squelettique et mettrons nos observations en regard avec l'obésité.

c) La sédentarité

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activité physique est très variable d'un individu à l'autre et représente la dépense énergétique liée à tout mouvement physique en

plus du métabolisme de base. On peut distinguer deux types d'activité physique, l'activité physique sportive, correspondant à la pratique d'un sport et l'activité physique quotidienne correspondant à la marche, à être debout, à porter une charge, etc. La dépense énergétique, liée à l'activité physique, dépend essentiellement des habitudes de vie de l'individu (sédentaire, sportif, etc.) mais aussi du type d'activité pratiquée (durée et intensité). Elle peut être très faible pour les personnes sédentaires et très importantes pour les sportifs.

Malheureusement, durant ces 50 dernières années, de drastiques modifications de nos modes de vies ont eu lieu contribuant à favoriser les comportements sédentaires. La mécanisation et l'industrialisation de notre société ont abouti à réduire toutes les tâches consommatrices d'énergie que ce soit au niveau des déplacements, du travail ou encore des tâches domestiques. L'Homme moderne marche de moins en moins, il circule en voiture, prend les transports en commun, utilise l'ascenseur, etc. Il peut ainsi se déplacer sans même utiliser d'énergie pour cela, si ce n'est, se tenir debout. Que ce soit dans les usines ou même sur les chantiers, l'Homme a créé des machines permettant de se décharger des tâches les plus fatigantes, c'est-à-dire celles nécessitant un coût énergétique très élevé. En effet, depuis l'avènement du pétrole en lien avec la mécanisation, les machines nous ont permis de diminuer les coûts énergétiques de nombreuses activités. La machine à laver, le lave linge, l'aspirateur sont autant d'innovations nous ayant fait gagner du temps dans la vie de tous les jours, nous permettant de nous consacrer à d'autres tâches plus intéressantes mais souvent moins énergivores. Un des comportements sédentaires les plus représentatif de notre société moderne est le temps passé assis ou le temps passé devant la télévision. A ce titre, ces deux indicateurs nous renseignent sur les habitudes de vies sédentaires que peuvent avoir les populations, c'est pourquoi leurs utilisations sont très souvent retrouvées dans les études épidémiologiques.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré très clairement que les comportements sédentaires favorisent le développement de l'obésité et du diabète de type 2, aussi bien chez l'enfant (Dietz and Gortmaker 1985; Andersen *et al.* 1998), chez la femme adulte (Tucker and Bagwell 1991; Hu *et al.* 2003) que chez l'homme adulte (Tucker and Friedman 1989; Ching *et al.* 1996; Coakley *et al.* 1998). Coakley *et al.* (1998) ont par exemple montré, en suivant environ 20 000 hommes durant 4 ans, que le temps passé devant la télévision est positivement associé à la prise de poids. De la même manière, en suivant plus

de 50000 femmes durant 6 ans, Hu *et al.* (2003) ont montré que le temps passé devant la télévision favorise le développement de l'obésité et du diabète de type 2. Comme l'illustre la figure 9 ci-dessous, ils ont estimé que l'augmentation de +2h/j de télévision augmente le risque de devenir obèse de +23% et le risque de développer un diabète de type 2 de +14% ou encore que l'augmentation de +2h/j passée en position assise au travail augmente le risque de développer une obésité de +5% et le risque de développer un diabète de type 2 de +7%. A l'inverse, ils ont démontré qu'un comportement actif, comme le fait d'être debout ou bien la marche, est associé avec une diminution du risque de devenir obèse ou de développer un diabète de type 2.

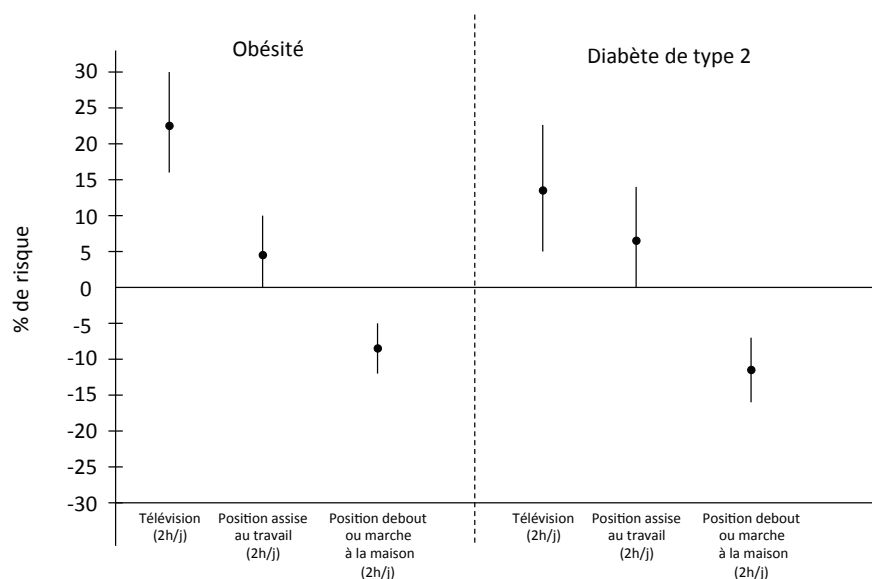


Figure 9 : Pourcentage de risque de développer une obésité ou un diabète de type 2 en fonction des habitudes de vies (adaptée de Hu *et al.*)

Un comportement sédentaire, comme regarder la télévision, contribue donc au développement de l'obésité en induisant potentiellement une balance énergétique positive. En effet, le temps passé assis à regarder la télévision est tout autant de temps que les individus ne passent pas à faire une autre activité plus énergivore. De plus, plusieurs études, soumettant des sujets à un repas *ad libitum* avec ou sans le visionnage de la télévision, mettent en évidence que la prise alimentaire est augmentée lorsque le repas est pris devant la télévision (Bellisle *et al.* 2004; Blass *et al.* 2006; Bellissimo *et al.* 2007; Temple *et al.* 2007) et que le repas suivant peut lui aussi être augmenté (Higgs and Woodward 2009).

Intéressons-nous maintenant, plus précisément, aux études d'intervention permettant d'étudier les effets de la sédentarité. Le « bed rest » est un modèle expérimental

permettant de mimer les effets d'une inactivité physique accrue en soumettant des sujets à rester en position allongée 24h/24 (avec un angle de -6°). Grâce à ce modèle, Ritz *et al.* ont mis en évidence que 42 jours d'inactivité physique induit, à jeun, une diminution de l'oxydation des lipides (Ritz *et al.* 1998). De même, Blanc *et al.* ont montré que 7 jours d'inactivité physique modifient les flux de substrats à jeun avec une diminution de l'oxydation lipidique chez l'homme et la femme (Blanc *et al.* 2000). Bergougnian *et al.* ont par la suite montré que 60 jours d'inactivité physique induit une diminution de l'oxydation lipidique totale aussi bien à jeun qu'en période post-prandiale contribuant à une accumulation de lipides au niveau du muscle squelettique (Bergougnian *et al.* 2009). De plus, à l'aide de traceurs lipidiques, les auteurs ont mis en évidence que c'est l'oxydation des acides gras saturés qui est diminuée alors que l'oxydation des acides gras mono-insaturé n'a été pas affectée.

La sédentarité est donc, sans nul doute, un acteur fort de la génèse de l'obésité, avec d'un côté une diminution des dépenses d'énergie associée à un comportement pouvant augmenter l'apport calorique et d'un autre côté une diminution de l'oxydation des lipides contribuant à leur stockage.

2. Le muscle squelettique

Le terme « muscle » provient du latin « *musculus* » qui signifie « petite souris ». Ce terme était autrefois employé pour désigner un muscle en particulier (situé au niveau du tibia) ayant une forme ovale s'apparentant à une souris. De nos jours, la seule relique de l'usage de ce terme « souris » est retrouvé en boucherie pour désigner la souris d'agneau par exemple.

Le corps humain est constitué de plus de 600 muscles dont certains très petits, comme le muscle stapédien, et d'autres très imposants comme le grand fessier. Les muscles squelettiques représentent environ 40% du poids corporel et contribuent pour 20 à 30% de la dépense énergétique de repos (Baker and Mottram 1973; Zurlo *et al.* 1990). C'est un des plus grand consommateur d'O₂ de l'organisme au repos, tout comme le cerveau (≈20%), le foie (≈20%) et le cœur (≈10%).

Les muscles squelettiques peuvent être considérés comme les « moteurs » de l'organisme car ils permettent d'assurer une motricité de manière volontaire en mettant en mouvement le squelette. L'organisme peut ainsi se mouvoir dans son environnement et interagir avec celui-ci.

Outre son importance locomotrice, posturale et thermogène, le muscle squelettique joue un rôle prépondérant dans la dépense énergétique et le métabolisme glucido-lipidique d'un individu. Son dysfonctionnement pourrait donc être central dans la genèse de l'obésité et du diabète. Nous rappellerons tout d'abord la structure et le métabolisme glucido-lipidique du muscle squelettique, puis nous discuterons plus longuement des effets de la surnutrition sur celui-ci.

2.1 Rappel de la structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique est organisé en faisceaux musculaires eux-mêmes composés de fibres musculaires. Chaque muscle squelettique est enveloppé dans son intégralité par du tissu conjonctif appelé epimysium ou encore aponévrose (figure 10). Ce tissu conjonctif qui enchâsse l'ensemble du muscle squelettique se poursuit de part et d'autre du muscle pour former les tendons permettant ainsi de rattacher le muscle à l'os.

Un faisceau musculaire est lui-même enchâssé dans du tissu conjonctif, le perimysium. Le perimysium permet de séparer chaque faisceau musculaire et c'est dans cet espace (entre chaque perimysium) que se trouvent les vaisseaux sanguins permettant l'approvisionnement des matières nécessaires à la production d'énergie utilisée pour la contraction. Chaque faisceau musculaire est lui-même composé de plusieurs fibres musculaires toutes enveloppées dans du tissu conjonctif, l'endomysium qui les délimite.

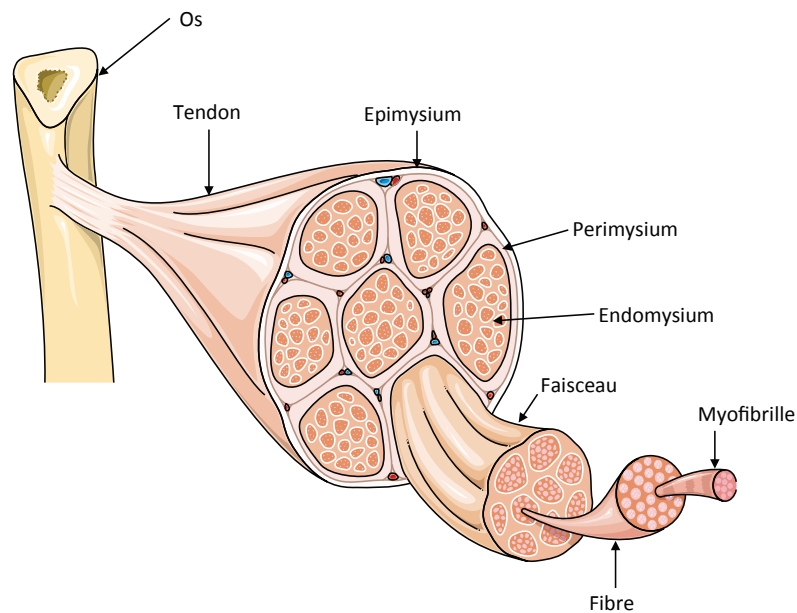


Figure 10 : Structure globale du muscle squelettique

2.1.1 Les fibres musculaires striées

Les fibres musculaires striées sont des cellules polynucléées issues de la fusion de centaines de précurseurs musculaires, les myoblastes. Ces cellules, de forme cylindrique, peuvent mesurer quelques millimètres jusqu'à plusieurs centimètres de longueur et ont un diamètre compris entre 20 et 100 μm . Les noyaux sont généralement retrouvés, plaqués contre la membrane plasmique de la fibre à cause de la machinerie enzymatique qu'elle contient.

2.1.2 Les myofibrilles

Chaque fibre musculaire contient un grand nombre de myofibrilles étant toutes parallèles les unes aux autres et parcourant la longueur de la cellule (figure 10). Les myofibrilles sont des éléments protéiques contractiles et cylindriques de la fibre musculaire et sont constituées de sarcomères (unité contractile). Les myofibrilles mesurent environ 1 à

2 μm de diamètre et enchâssent les mitochondries. Elles représentent environ 80% du volume de la fibre musculaire. Comme illustré dans la figure 11 ci-dessous, une myofibrille est constituée d'une alternance de bandes I (bandes claires), de bandes A (bandes sombres) et de lignes Z séparant en deux les bandes I. A l'échelle de la cellule, toutes les bandes I et A sont parfaitement alignées, d'où l'appellation de fibre musculaire striée.

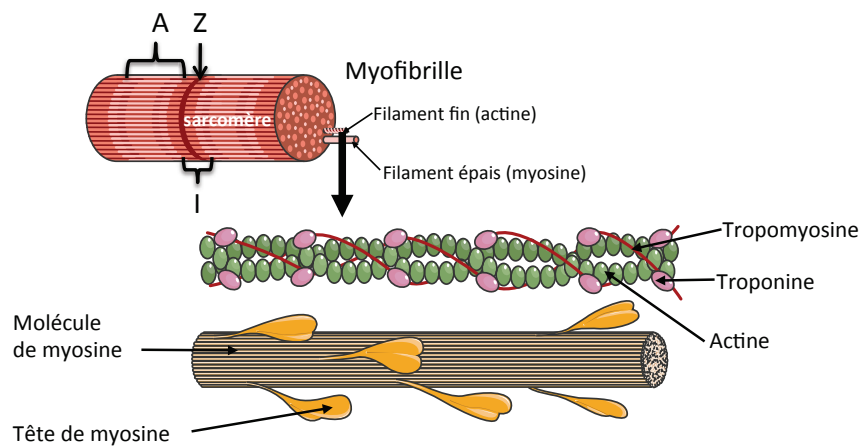


Figure 11 : Structure d'une myofibrille

2.1.3 Le sarcomère

Comme illustré dans la figure 11 ci-dessus, un sarcomère est composé de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine. En présence d'adénine triphosphate (ATP) et de calcium, les filaments d'actine et de myosine sont capables de glisser les uns contre les autres permettant ainsi le raccourcissement du sarcomère et donc la contraction musculaire.

Les filaments épais de myosine sont composés de chaînes lourdes de myosine enroulées en doubles hélices possédant chacune une tête globulaire capable d'interagir avec les filaments d'actine. Ils sont aussi composés de chaînes légères régulatrices phosphorylables. La myosine est à la fois une protéine de structure et une enzyme. Il existe quatre isoformes de la myosine chez les mammifères Myosin Heavy Chain (MyHC) : I, IIa, IIx ou IIb (Gundersen 2011).

Les filaments fins d'actine sont composés de monomères d'actines polymérisés et forment des chaînes linéaires d'actine F s'enroulant par paires en doubles hélices. Ces filaments ancrés à la ligne Z, sont aussi composés de protéines régulatrices, la tropomyosine et la troponine. La tropomyosine forme un filament au niveau du sillon de l'actine

permettant ainsi de masquer le domaine de fixation à la myosine. La troponine est composée de trois sous-unités ayant chacune une fonction différente. Une sous-unité est capable de lier l'actine, une autre est capable de lier la tropomyosine et la dernière est capable de fixer le calcium indispensable à la contraction musculaire.

2.2 Le métabolisme glucido-lipidique et ses voies métaboliques

Le muscle squelettique, comme tout organe, a besoin d'énergie pour fonctionner et assurer ses fonctions. Il est capable d'utiliser et de métaboliser différents substrats afin d'assurer, au final, la formation d'ATP nécessaire à sa contraction. Ne disposant que d'une très faible quantité d'ATP, le muscle doit sans cesse reformer de l'ATP à partir de différentes voies métaboliques libérant de l'énergie. Il existe de nombreuses voies métaboliques permettant la synthèse d'ATP. On peut distinguer trois grands systèmes permettant de générer de l'énergie (figure 12) :

-le **métabolisme anaérobie alactique** (utilisant l'ATP ou la phosphocréatine),

-le **métabolisme anaérobie lactique** (utilisant le glucose sanguin ou le glycogène intramusculaire)

-le **métabolisme aérobie** (utilisant le glucose sanguin ou le glycogène intramusculaire ou les acides gras sanguins ou les triglycérides intramusculaires).

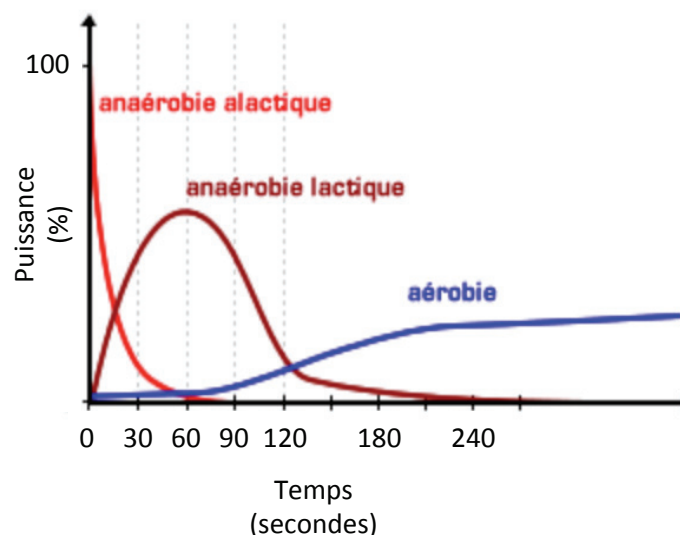


Figure 12 : Types de métabolismes utilisés en fonction de la puissance et du temps de l'exercice (adaptée d'Howald 1974)

En fonction de l'activité physique pratiquée, de son intensité et de sa durée, le muscle utilisera différentes voies métaboliques pour la resynthèse d'ATP (Lacour 2011). D'une manière générale, les systèmes anaérobies sont utilisés pour répondre à des efforts de forte intensité et de courte durée, tandis que le métabolisme aérobie est sollicité pour faire face à des efforts de longue durée et de faible intensité. Il est important de noter que les efforts de la vie quotidienne sont généralement longs et de faible intensité. Ainsi, la fourniture d'énergie aux muscles squelettiques est essentiellement due au métabolisme aérobie. Dans ce manuscrit, nous nous intéresserons donc essentiellement au métabolisme glucido-lipidique aérobie et nous n'aborderons pas les métabolismes anaérobies.

Le métabolisme aérobie (consommant de l'O₂) des glucides ou des lipides permet la synthèse d'ATP au niveau de la mitochondrie. L'oxydation des substrats énergétiques aboutit à la formation de coenzyme réduit qui entre alors dans la mitochondrie afin de faire fonctionner la chaîne respiratoire permettant ainsi la synthèse d'ATP. Comme illustré par la figure 13 ci-dessous, nous allons maintenant détailler différentes voies métaboliques (**glycolyse, β -oxydation et cycle de Krebs**) ainsi que le fonctionnement de la chaîne respiratoire du muscle squelettique.

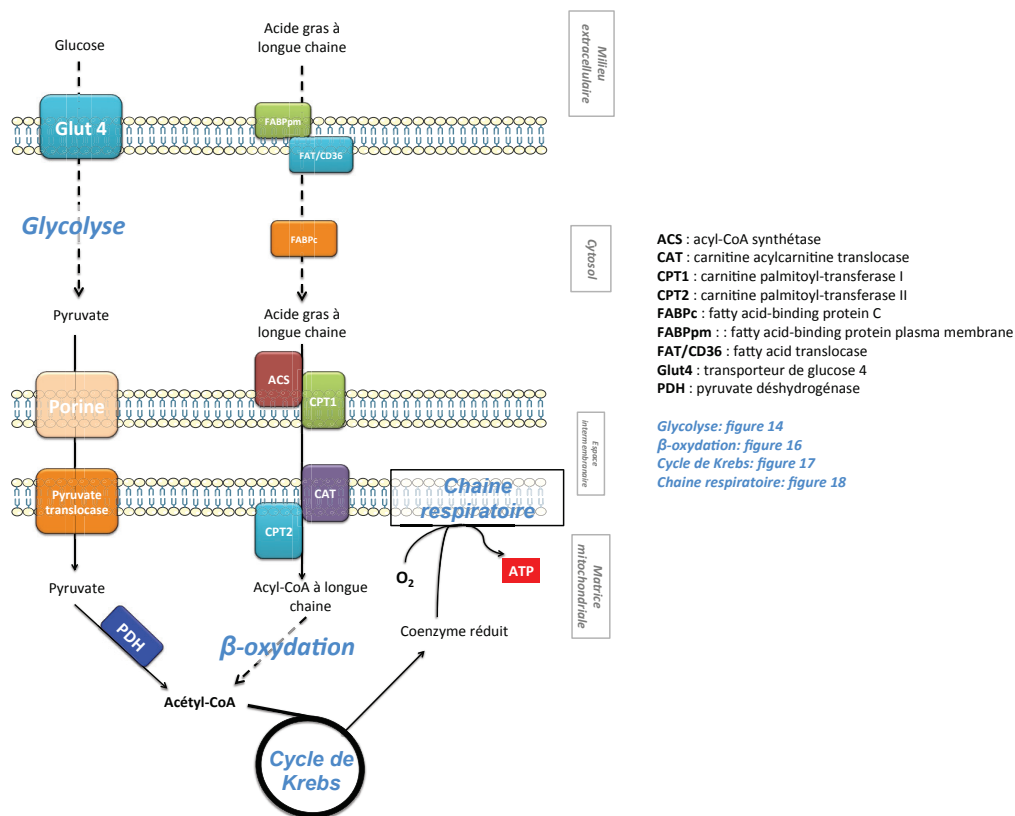


Figure 13 : Schéma global simplifié du métabolisme aérobie des glucides et des lipides

Nous suivrons le cheminement des substrats depuis leurs entrées jusqu'à leurs oxydations. Nous nous intéresserons aussi, tout particulièrement, à différentes enzymes comme la pyruvate déshydrogénase (PDH) et la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1) et leurs régulateurs respectifs afin de mieux comprendre leurs rôles dans l'orientation des substrats entre stockage et oxydation.

2.2.1 *Le métabolisme des glucides*

a) *Les apports en glucides*

En fonction de l'état (nourri ou à jeun), le muscle squelettique peut utiliser deux sources glucidiques pour la synthèse d'ATP. Il peut soit mobiliser son stock de glycogène ou alors utiliser le glucose sanguin sous l'action de l'insuline.

- *Le glucose sanguin*

La captation du glucose sanguin à travers la membrane plasmique du muscle squelettique est réalisée par des transporteurs (Glut) permettant le transport facilité du glucose. Il existe différentes isoformes de transporteurs Glut (Glut1 à Glut12). Le muscle squelettique exprime majoritairement Glut1 et 4. Le transport basal du glucose est majoritairement réalisé par Glut1 qui présente une faible vitesse de transport du glucose et est saturable pour des glycémies de 5.5 mM. Néanmoins, le transport de glucose peut être augmenté d'un facteur 15 à 20 grâce au recrutement à la membrane plasmique de Glut4 sous l'action de l'insuline. De manière schématique, Glut4 est stocké dans des vésicules intracellulaires avant d'être recruté à la membrane sous l'action de l'insuline ou de la contraction musculaire (Roy and Marette 1996; Roy *et al.* 1997). Le muscle squelettique exprime aussi d'autres isoformes comme Glut8 (Doege, Schürmann, *et al.* 2000), Glut9 (Doege, Bocianski, *et al.* 2000), Glut11 (Doege *et al.* 2001) et Glut12 (Rogers *et al.* 2002) mais leurs rôles restent encore mal connus.

- *Les stocks de glycogène*

Le muscle squelettique peut aussi utiliser les stocks de glycogène qu'il possède pour synthétiser de l'ATP. Le glycogène, formé d'une longue chaîne de glucose ramifiée, est une forme de stockage cellulaire du glucose. Sa synthèse est réalisée par la glycogène synthétase et à l'inverse sa dégradation est réalisée par la glycogène phosphorylase. Ces deux voies

métaboliques sont réciproquement régulées par jeu de phosphorylation/déphosphorylation (protéine kinase A et protéine phosphatase) en fonction de la stimulation hormonale (Yki-Järvinen *et al.* 1987).

b) La glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique cytoplasmique qui, à partir d'une molécule de glucose, forme deux molécules de pyruvate, deux molécules d'ATP et deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) (figure 14).

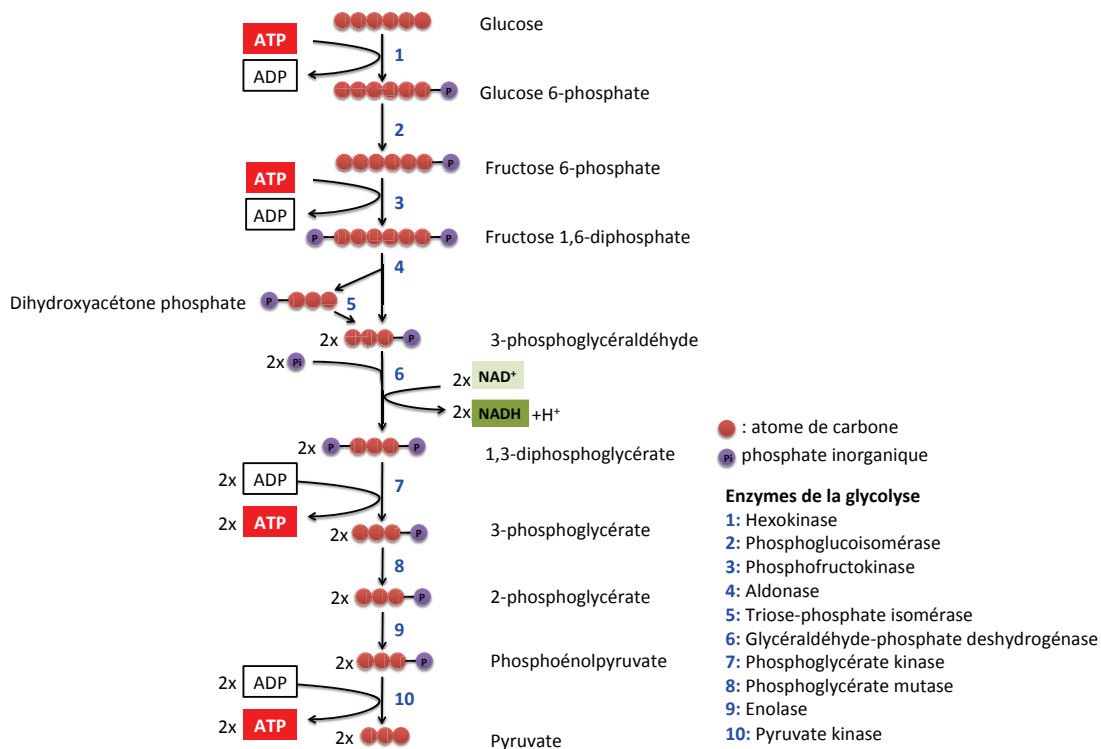


Figure 14 : Schéma simplifié de la glycolyse

Le pyruvate formé pourra ensuite entrer dans la mitochondrie à l'aide de transporteurs et être décarboxylé en acétyl-CoA sous l'action de la PDH. L'acétyl-CoA, ainsi généré dans la mitochondrie, pourra alimenter le cycle de Krebs et ainsi fournir d'autres coenzymes réduits à la mitochondrie (figure 12). Nous reviendrons plus tard sur la réaction de formation de l'acétyl-CoA par le pyruvate déshydrogénase et nous développerons son importance.

Le NADH formé par la glycolyse permettra aussi la formation d'ATP au niveau de la mitochondrie. Ce coenzyme réduit peut, en effet, entrer dans la mitochondrie à l'aide de différentes navettes (malate/aspartate ou α -glycérophosphate).

2.2.2 *Le métabolisme des lipides*

a) *Les apports en lipides*

De même que pour les glucides, les lipides oxydés par le muscle squelettique proviennent de deux sources différentes. Le muscle squelettique peut ainsi oxyder des acides gras provenant du stock de triglycérides intracellulaires ou alors oxyder des acides gras provenant du flux sanguin.

- *Les lipides sanguins*

Le flux sanguin apporte des acides gras au muscle sous la forme d'acides gras libres (AGL) liés à l'albumine ou sous la forme de triglycérides contenus dans des chylomicrons ou very low density lipoprotein (VLDL) (figure 15). Ces derniers seront libérés par l'hydrolyse des TG par la lipoprotéine-lipase (LPL) libérant ainsi des acides gras.

En fonction de leur taille, les acides gras pourront passer la membrane plasmique par diffusion simple ou par diffusion facilitée grâce à des protéines comme la fatty acid transport protein 1/4 (FATP1/4), la fatty acid binding protein plasma membrane (FABPm) et la fatty acid translocase (FAT/CD36) (Hamilton and Kamp 1999; Luiken *et al.* 1999; Turcotte *et al.* 1999; Koonen *et al.* 2005; Glatz *et al.* 2010) (figure 15).

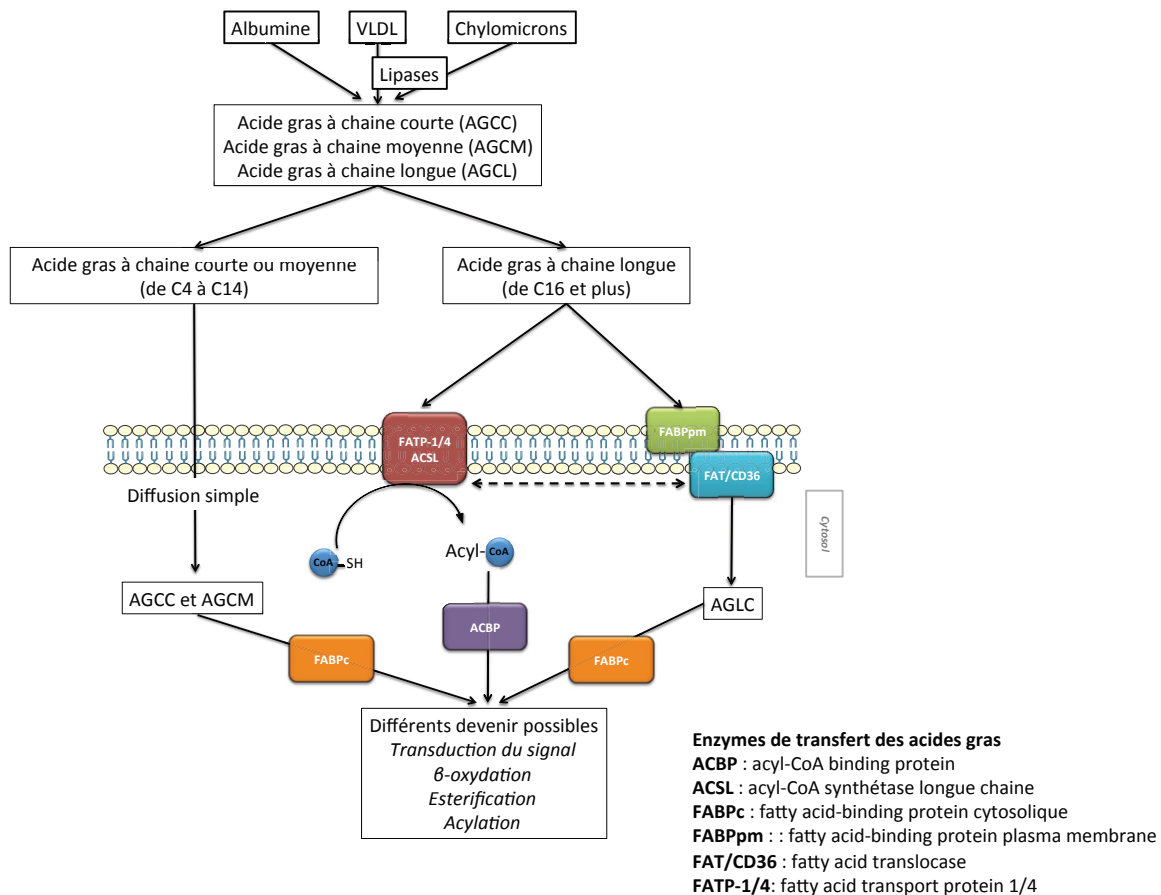


Figure 15 : Passage des acides gras du sang au milieu intracellulaire du muscle squelettique en fonction de la taille des acides gras (d'après Koonen *et al.* 2005)

• **Les triglycérides intracellulaires**

Le muscle squelettique possède des stocks de triglycérides intracellulaires lui permettant de mobiliser des acides gras comme source d'énergie. Ils sont stockés sous forme de triglycérides proches des mitochondries (Glatz *et al.* 2010).

b) L'entrée des lipides dans la mitochondrie

Les acides gras à chaîne courte et moyenne traversent la membrane mitochondriale par diffusion simple alors que l'entrée des acides gras à chaîne longue requiert différentes enzymes comme CPT1, CPT2, CAT (carnitine-acylcarnitine translocase) (Eaton *et al.* 1996; Kerner and Hoppel 2000) (Figure 13). Il semble aussi que FAT/CD36 soit impliqué (Bezaire *et al.* 2006) au niveau de la mitochondrie. Il est très important de noter que l'étape limitante de l'oxydation lipidique réside dans le transfert des acides gras à chaîne longue par CPT1 (Kerner and Hoppel 2000). Nous reviendrons, par la suite, sur le contrôle de l'oxydation lipidique par CPT1.

c) La beta-oxydation

La β -oxydation appelée aussi l'hélice de Lypen correspond à l'oxydation des acides gras permettant de former des coenzymes réduits ($FADH_2$ et $NADH$) et de l'acétyl-CoA.

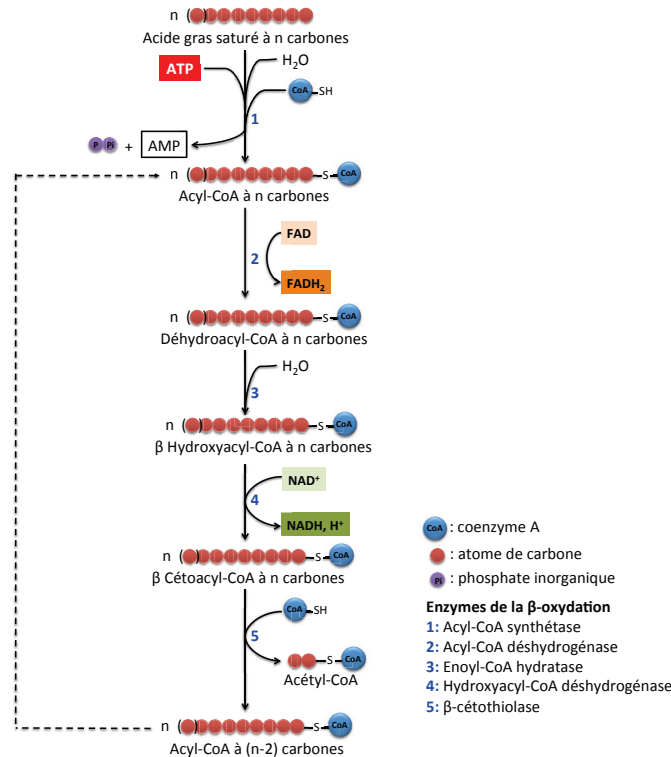


Figure 16 : Schéma simplifié de la β -oxydation

Un cycle de β -oxydation aboutit à la formation d'un Acyl-CoA possédant deux carbones en moins et génère un $FADH_2$, un $NADH$ et un acétyl-CoA. Les coenzymes réduits alimenteront par la suite la phosphorylation oxydative de la mitochondrie afin de fournir de l'ATP à la cellule. L'acétyl-CoA, quant à lui, alimentera le cycle de Krebs permettant aussi la formation d'autres coenzymes réduits.

2.2.3 Le carrefour métabolique de la glycolyse et de la beta-oxydation : le cycle de Krebs

Comme nous venons de le voir, la glycolyse et la β -oxydation contribuent à générer des précurseurs qui alimentent le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs permet, quant à lui, la formation de coenzymes réduits à partir d'acétyl-CoA (figure 17). Il est important de noter que c'est grâce à ce cycle que le métabolisme des glucides et celui des lipides sont interconnectés.

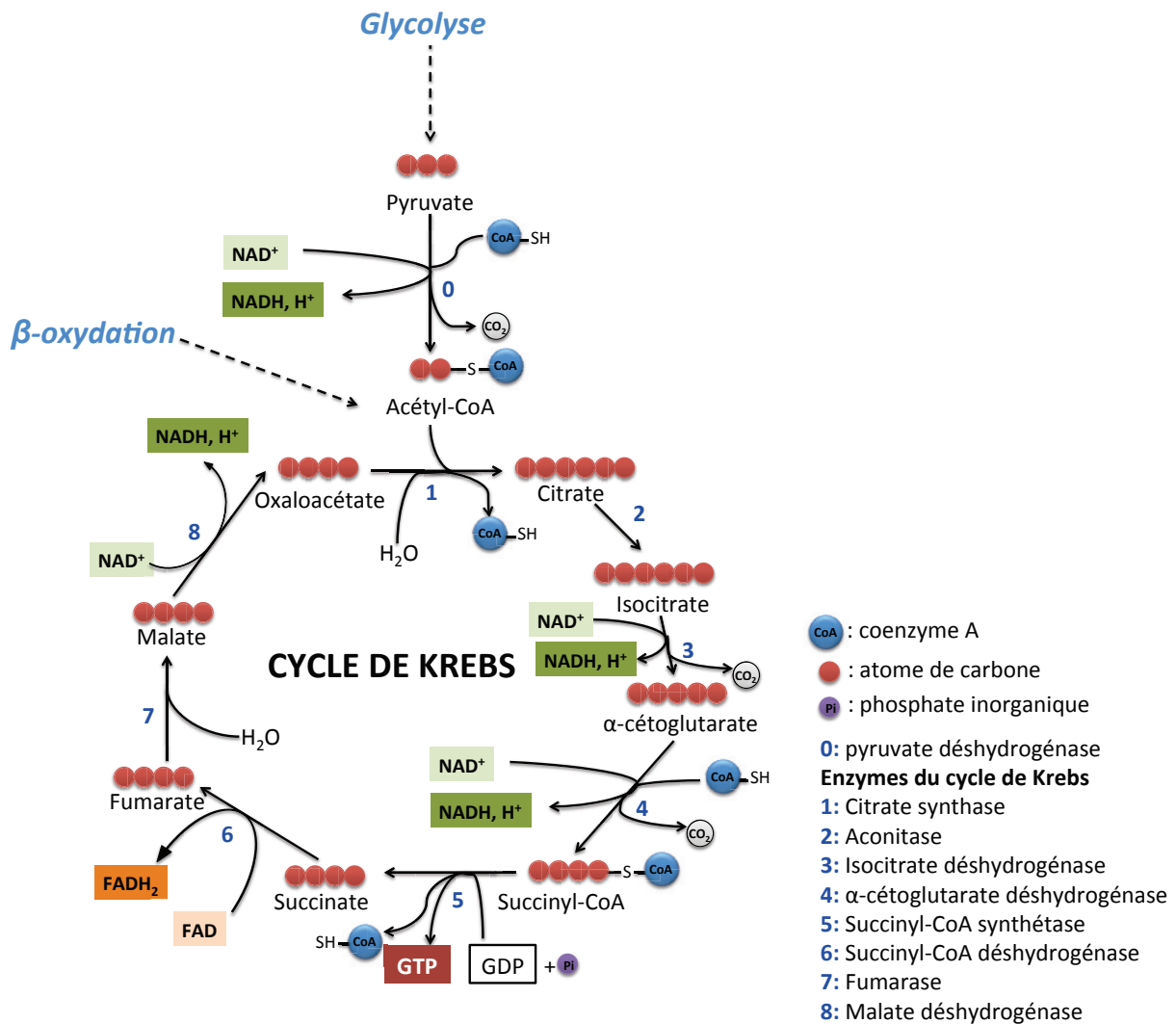
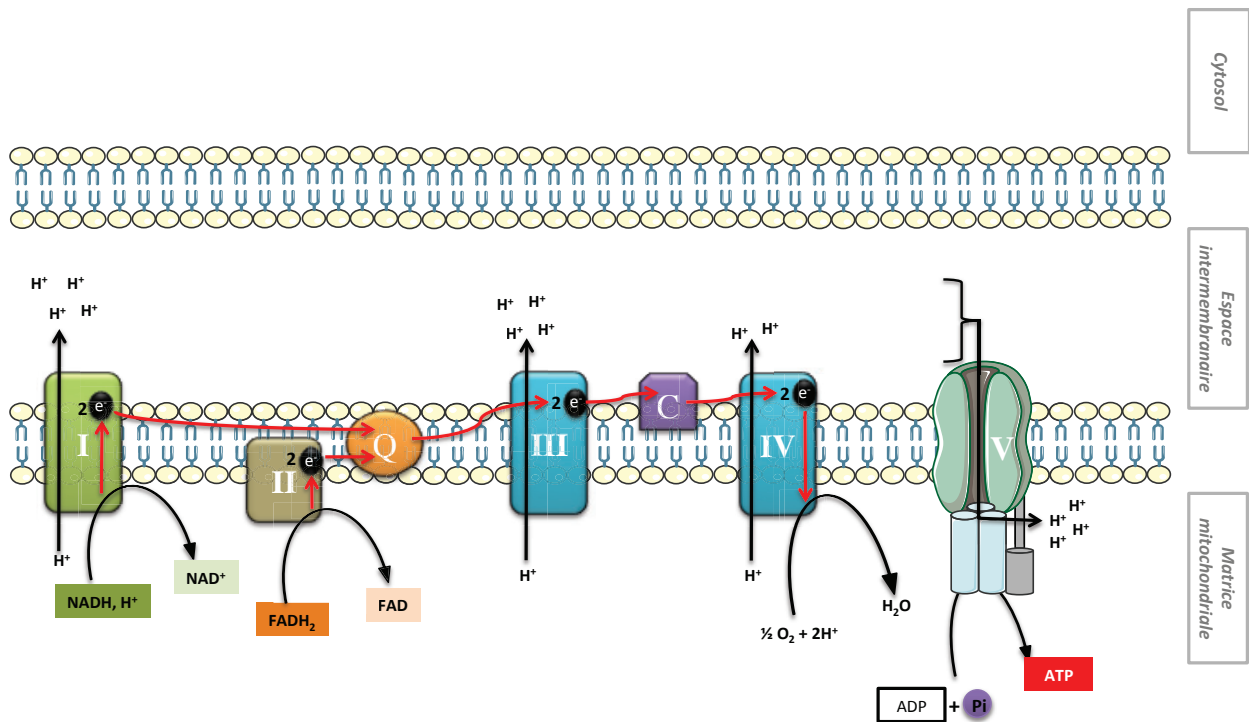


Figure 17 : Le cycle de Krebs

2.2.4 La phosphorylation oxydative de la chaine respiratoire

Dans la mitochondrie, les coenzymes réduits cèdent leurs deux électrons aux complexes enzymatiques de la chaine respiratoire qui transfère ces électrons par une cascade de réactions d'oxydo-réduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène moléculaire. Ce transfert d'électrons permet aux complexes de la chaine respiratoire de « pomper » des atomes d'hydrogène dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie créant ainsi un gradient électrochimique de protons. Cette force protomotrice va alors permettre la synthèse d'ATP grâce à l'ATP synthétase. La respiration et la phosphorylation de l'ADP sont donc couplées via ce gradient de protons, on parle ainsi de la phosphorylation oxydative.



- e^- : électron
- P_i : phosphate inorganique
- I : complexe I ou NADH-ubiquinone oxydoréductase
- II : complexe II ou succinate-ubiquinone oxydoréductase
- Q : coenzyme Q ou ubiquinone
- III : complexe III ou ubiquinol-cytochrome C oxydoréductase
- C : cytochrome C
- IV : complexe IV ou cytochrome oxydase
- V : complexe V ou ATP synthétase

Figure 18 : La phosphorylation oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale

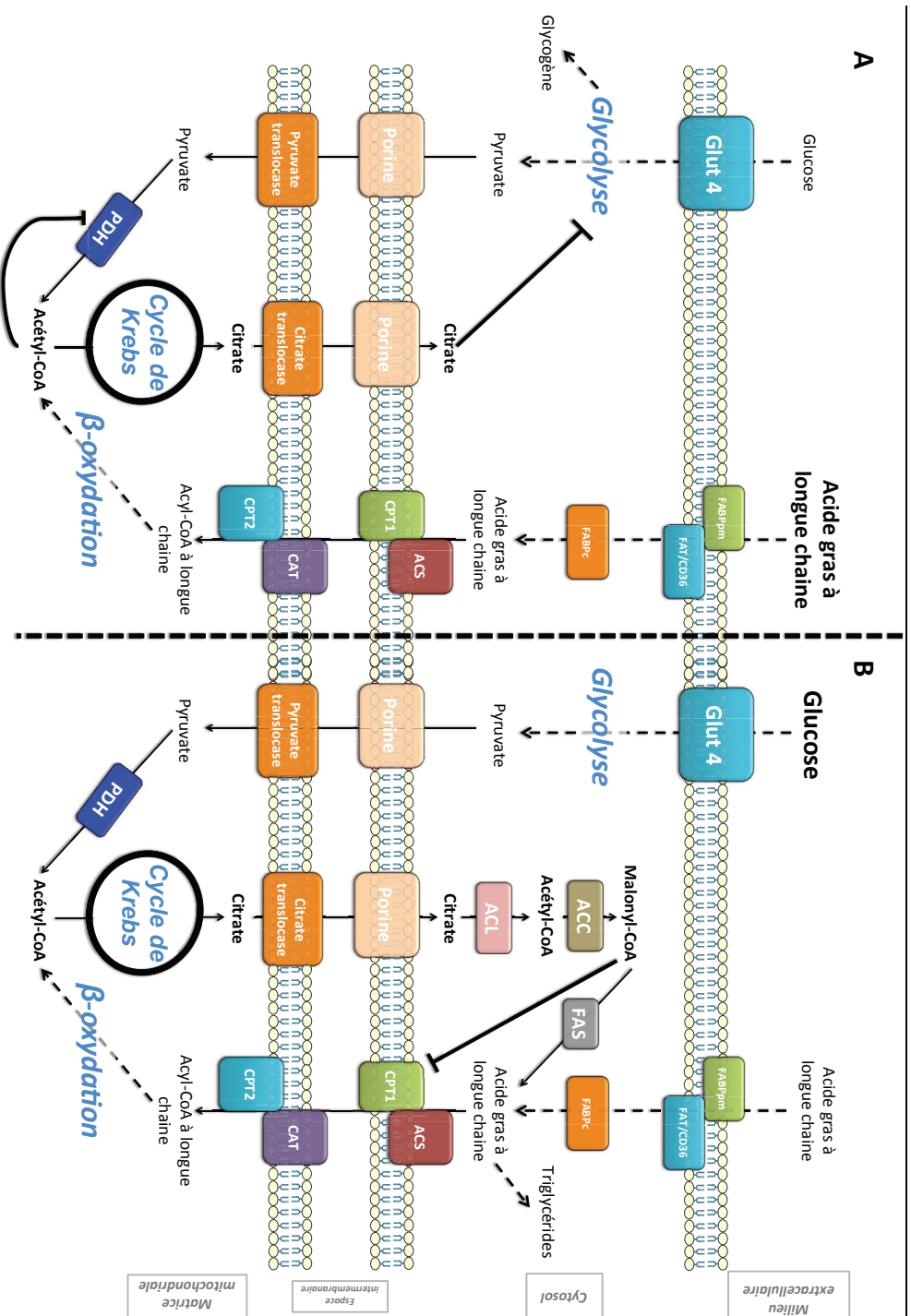
2.3 La régulation des flux métaboliques

2.3.1 Le cycle de Randle, la compétition entre acide gras et glucose

Randle *et al.* ont été les premiers à démontrer l'importance des niveaux d'acides gras circulant sur la régulation du métabolisme glucidique (figure 19A). Ils ont identifié que les acides gras inhibent la captation de glucose, la glycolyse et l'oxydation du pyruvate à partir d'expérience *in vitro* sur coeurs isolés et perfusés de rats (Randle *et al.* 1963). En augmentant la concentration en acides gras libres du milieu de perfusion, ils ont montré une réduction du captage et de l'utilisation du glucose par le myocarde. Les auteurs de cette

étude ont identifié par quels mécanismes les acides gras permettent une réduction de l'oxydation des glucides. Les acides gras, en empruntant la β -oxydation, génèrent de l'acétyl-CoA au niveau de la mitochondrie ayant pour conséquence une inhibition directe et indirecte des flux de substrats glycolitiques. D'un côté, l'augmentation du ratio acétyl-CoA/CoA a un effet inhibiteur direct sur le pyruvate deshydrogénase empêchant ainsi au pyruvate d'emprunter le cycle de Krebs. D'un autre côté, l'augmentation du ratio d'acétyl-CoA/CoA induit, de manière indirecte, une augmentation de la concentration en citrate ayant pour conséquence l'inhibition de la 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1) limitant ainsi le flux glycolytique et provoquant une accumulation en amont de glucose-6-phosphate (G6P). Cette accumulation de G6P va alors inhiber l'hexokinase et contribuer à diminuer la captation de glucose. Ce concept a, par la suite, été étendu au muscle squelettique et il s'avère que la pyruvate déshydrogénase joue un rôle prépondérant dans l'orientation et l'équilibre des flux de substrats au niveau du muscle squelettique (Randle *et al.* 1988).

Par la suite McGarry *et al.* ont démontré qu'il existait une relation inverse au cycle de Randle, c'est-à-dire que le niveau de glucose est capable de freiner l'oxydation lipidique (McGarry *et al.* 1977). Les auteurs de cette étude ont mis en évidence, dans un premier temps au niveau du foie, qu'une forte disponibilité en glucose est capable d'augmenter les concentrations en malonyl-CoA et ainsi d'inhiber l'entrée des acides gras dans la mitochondrie réorientant alors les lipides vers le stockage. Ce concept a, par la suite, été étendu au niveau du myocarde et du muscle squelettique (McGarry 1998).



- ACC: acétyl-CoA carboxylase
- ACS : acyl-CoA synthétase
- ACL: ATP citrate lyase
- CAT : carnitine acylcarnitine translocase
- CPT1 : carnitine palmitoyl-transférase I
- CPT2 : carnitine palmitoyl-transférase II
- FABPm : : fatty acid-binding protein plasma membrane
- FAS: fatty acid synthase
- FAT/CD36 : fatty acid translocase
- Glut4 : transporteur de glucose 4
- PDH : pyruvate déshydrogénase

Figure 19 : Mécanisme d'inhibition de l'oxydation des glucides par les acides gras (A) et mécanisme d'inhibition de l'oxydation des lipides par le glucose (B) (d'après Hue and Taegtmeyer 2009)

Comme illustré dans la figure 19B, lorsque la concentration en glucose augmente, la glycolyse, la PDH et le cycle de Krebs contribuent à augmenter les niveaux de citrate cytosolique aboutissant à une augmentation des niveaux d'acétyl-CoA cytosolique. Sous l'action de l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (ACC ou ACACA), l'acétyl-CoA induit une accumulation de malonyl-CoA qui inhibe fortement l'entrée des acides gras dans la mitochondrie par CPT1.

Ces régulations respectives montrent à quel point le métabolisme du glucose et le métabolisme des acides gras sont interconnectés et comment la disponibilité d'un substrat impacte l'oxydation et le stockage de l'autre (Hue and Taegtmeyer 2009). Ces bases biochimiques de régulation entre substrats nous permettent de mieux comprendre comment la dérégulation du métabolisme des glucides ou des lipides peut affecter la gestion des flux de substrats au niveau du muscle squelettique. Ainsi, une élévation de la glycémie peut inhiber l'oxydation des lipides et contribuer à l'accumulation intracellulaire de triglycérides pouvant engendrer des phénomènes de lipotoxicité et contribuer à l'insulino-résistance. De même, une baisse de la concentration en acides gras libres peut aussi être à l'origine d'une baisse de l'oxydation lipidique.

Bien entendu, les métabolismes glucidiques et lipidiques, outre les régulations biochimiques que nous venons de voir, sont aussi régulés par l'environnement hormonal favorisant l'oxydation d'un substrat ou de l'autre. Nous allons maintenant détailler les différents régulateurs pouvant contribuer à activer ou inhiber les deux systèmes enzymatiques clés (PDH et CPT1) régulant les flux de substrats.

2.3.2 Le rôle central de la pyruvate déshydrogénase

L'activité de la pyruvate déshydrogénase est régulée de manière allostérique par les niveaux de produits ou de substrats dont elle dispose (Randle 1995). De plus, l'activité de cette enzyme mitochondriale est régulée par jeu de phosphorylation/déphosphorylation. Comme illustré dans la figure 20 ci-dessous, les pyruvates déshydrogénases kinases (PDK) phosphorylent et inactivent la PDH tandis que les pyruvates déshydrogénases phosphatases (PDP) déphosphorylent et activent la PDH. La PDH possède trois sites de phosphorylation inhibant son activité et ayant une affinité spécifique différente entre les isoformes de PDK (Patel and Korotchkina 2006).

Le muscle squelettique exprime différemment quatre isoformes de PDK (PDK1, PDK2, PDK3 et PDK4) (Gudi *et al.* 1995; Rowles *et al.* 1996) et 2 isoformes de PDP (PDP1 et PDP2) (Huang *et al.* 1998). Les isoformes PDK4, PDK2 (Kim *et al.* 2006) et PDP1 (Huang *et al.* 1998) sont les plus exprimées au niveau du muscle squelettique.

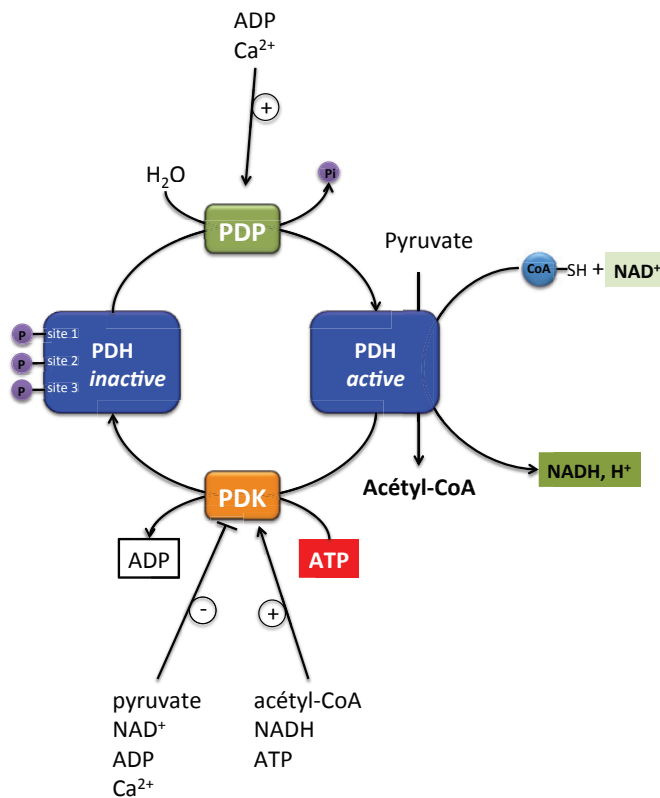


Figure 20 : Mécanisme de régulation de l'activité de la PDH par PDK et PDP (d'après Holness and Sugden 2003)

L'activité des pyruvates déshydrogénases kinases est stimulée par l'augmentation des niveaux en acétyl-CoA, NADH et ATP, et à l'inverse inhibée par l'élévation des niveaux en pyruvate, NAD⁺, ADP et Ca²⁺ (Bowker-Kinley *et al.* 1998) (figure 20). L'activité des pyruvates déshydrogénases phosphorylases est stimulée par l'augmentation en ADP et Ca²⁺.

Ces régulations permettent ainsi de favoriser la forme active de la PDH en situation de déficit énergétique (augmentation du ratio ADP/ATP; NAD⁺/NADH) et lors de contractions pour fournir de l'énergie à la cellule à partir du glucose. A l'inverse, en situation d'excès énergétique (diminution du ratio CoA/acétyl-CoA, ADP/ATP et NAD⁺/NADH) l'inactivation de la PDH permet alors l'épargne du glucose.

L'insuline est capable, par une cascade de réaction enzymatique, de favoriser la glycolyse et l'oxydation du glucose en jouant sur le recrutement de Glut4 à la membrane mais aussi en activant la PDH grâce à la stimulation de l'activité de la PDP1 et 2 par la PKC.

2.3.3 Le rôle central de la concentration en malonyl-CoA

Comme nous l'avons vu précédemment, la concentration en malonyl-CoA régule l'activité de CPT1 et donc le devenir des acides gras. Deux enzymes cytoplasmiques sont responsables de la formation/dégradation du malonyl-CoA, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la malonyl-CoA décarboxylase (MLYCD) respectivement.

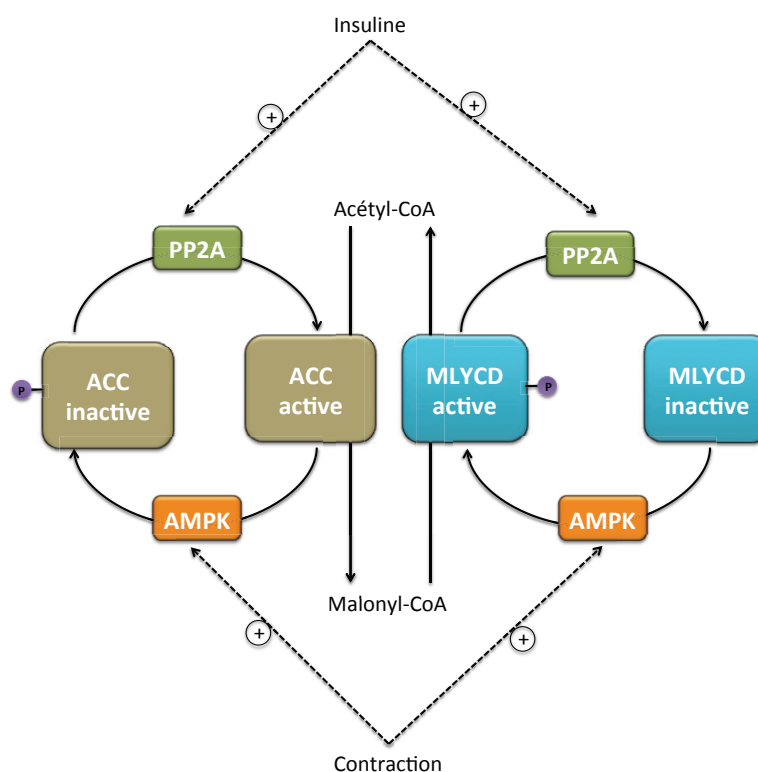


Figure 21 : Mécanisme de régulation de l'activité de l'ACC et de MLYCD par l'AMPK et PP2A (d'après Saha *et al.* 2000)

Le muscle squelettique exprime principalement deux isoformes de l'ACC (ACC1 ou ACACA et ACC2 ou ACACB) (Abu-Elheiga *et al.* 1997). L'activité des ACCs est elle aussi régulée de manière allostérique, elle est augmentée par des niveaux élevés en citrate ou en acétyl-CoA et est diminuée par des niveaux élevés en acyl-CoA à longue chaîne (Lane *et al.* 1974; Ogiwara *et al.* 1978; Trumble *et al.* 1995; Munday 2002). De plus, l'activité des ACCs est contrôlée par phosphorylation/déphosphorylation comme illustré dans la figure 21. La

protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est capable de phosphoryler l'ACC la rendant ainsi inactive alors que la protéine phosphatase 2A (PP2A) est capable de déphosphoryler l'ACC la rendant ainsi active (Brownsey *et al.* 2006; Fediuc *et al.* 2006). A l'inverse, l'AMPK est capable de phosphoryler MLYCD, la rendant ainsi active tandis que PP2A est capable de la déphosphoryler, la rendant ainsi inactive (Alam and Saggerson 1998; Saha *et al.* 2000).

Ces régulations permettent de favoriser l'oxydation des glucides lors d'une stimulation à l'insuline et de favoriser l'oxydation des lipides lors d'une contraction en modulant la quantité de malonyl-CoA.

Après avoir vu les voies métaboliques impliquées dans l'oxydation et le stockage des substrats et comment celles-ci sont régulées, nous allons maintenant détailler les effets d'un excès calorique sur la modulation de ces voies.

3. Les adaptations du muscle squelettique à la surnutrition

3.1 Le modèle de surnutrition

La surnutrition est un très bon modèle expérimental permettant d'appréhender les phases précoces de l'obésité. En effet, ce modèle de balance énergétique positive permet de comprendre comment l'organisme gère les flux de substrats et quels sont les mécanismes mis en jeu lors de la prise de poids. Ce modèle consiste à augmenter artificiellement les apports énergétiques journaliers (AEJ) d'un organisme pendant une période donnée. Il nous permet donc d'étudier à court et moyen terme quelles sont les conséquences d'une balance énergétique positive.

La littérature scientifique est très riche en études de surnutrition, que ce soit chez l'animal ou encore chez l'Homme. Les types de surnutrition sont très divers en allant de la prise d'une solution de glucose ou fructose à des apports plus ou moins complexes d'aliments industrialisés. Il est évident qu'un organisme ne gère pas de la même façon un excès calorique provenant de protéines, de lipides, de glucides ou même d'un mélange des trois. Les études de surnutrition réalisées chez l'animal apparaissent être de bons modèles pour l'étude de la prise de poids et de ses conséquences cardio-métaboliques délétères, cependant elles induisent de manière rapide et exagérée une prise de poids importante. De plus, même s'il est plus éthique et plus simple de réaliser des études de surnutrition chez l'animal, ces données ne sont que partiellement transposables à l'Homme.

En 1902, R.O. Neumann fut le premier à étudier la régulation du poids corporel en se soumettant lui-même, pendant un an, à différents apports caloriques (1766, 2199 et 2403 kcal/jour) (Neumann 1902). Ainsi, il démontra que son poids était constant et qu'il existerait des mécanismes dissipateurs d'énergie sous forme de chaleur permettant de réguler le poids corporel. De la même manière en 1922, le physiologiste américain A. Gulick s'est soumis, pendant 370 jours, à différents apports caloriques (de 1874 à 4113 kcal/j) en portant une attention particulière à son activité physique (Gulick 1995). Ces études de surnutrition ont permis de poser les bases de la régulation du poids corporel, en mettant en évidence que, dans une certaine mesure, le corps humain est capable de maintenir un poids stable

avec différents apports caloriques. Ce mécanisme permettant, dans une certaine limite, de dissiper l'énergie sous forme de chaleur a été dans un premier temps nommé « luxus consumption » puis ce terme fut, petit à petit, remplacé par le terme de « thermogénèse ». Ce mécanisme explique en partie, les différences de prise poids pour un même apport calorique.

Ces premières études de surnutrition ont ouvert la voie à d'autres études qui se sont tout particulièrement intéressées à caractériser le rôle des différents acteurs de la balance énergétique entraînant une prise de poids (qualité et quantité de l'apport alimentaire, métabolisme de base, thermogénèse induite par l'alimentation et activité physique). En modulant les apports caloriques (quantité et qualité), la durée de la surnutrition (court, moyen et long terme) et la population étudiée (age, sexe et IMC), les chercheurs ont ainsi pu caractériser une partie des mécanismes impliqués dans la prise de poids.

En 1990, Claude Bouchard eut l'idée d'étudier l'impact du patrimoine génétique sur la prise poids, en soumettant des jumeaux monozygotes à une même surnutrition (+1000kcal/j), 6 jours par semaine pendant 100 jours (Bouchard *et al.* 1990). Les auteurs ont ainsi montré qu'il existe une grande hétérogénéité des prises de poids (de 4,3 à 13,3 kg). En revanche, ils ont démontré qu'au sein même d'une paire de jumeaux, il existe une très forte similitude dans la réponse à la suralimentation pour le gain de poids et de masse grasse. Ils ont ainsi mis en évidence l'importance du patrimoine génétique dans l'adaptation à la surnutrition.

Comme nous le disions auparavant, de nombreuses études de surnutrition ont été réalisées avec différents types d'apports caloriques, permettant ainsi de caractériser les effets différentiels des macronutriments sur la prise de poids et leurs conséquences métaboliques. A ce titre, différentes études de surnutrition ont comparé l'effet des lipides vs. glucides (Horton *et al.* 1995; Lammert *et al.* 2000; Dirlwanger *et al.* 2000) ou encore du glucose vs. fructose (Ngo Sock *et al.* 2010; Stanhope *et al.* 2009).

Les nouvelles techniques de biologie moléculaire par puce à ADN ont permis d'approfondir et d'affiner notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la prise de poids à l'échelle du tissu. Ainsi, beaucoup d'études se sont, tout particulièrement, intéressées à l'impact de la surnutrition sur l'expression génique du tissu adipeux sous-cutané (Meugnier *et al.* 2007; Pasarica *et al.* 2009; Shea *et al.* 2009; Alligier *et*

al. 2012; Alligier *et al.* 2013). En revanche, relativement peu d'études ont été consacrées à étudier l'impact de la surnutrition sur l'expression génique du muscle squelettique (Lê *et al.* 2008; Samocha-Bonet *et al.* 2012).

3.2 Les effets d'une surnutrition sur le métabolisme énergétique

Avant de discuter plus en détails des mécanismes moléculaires prenant place dans le muscle squelettique à la suite d'un excès calorique, nous allons nous intéresser aux conséquences globales d'une surnutrition sur la dépense énergétique de repos (DER qui équivaut au métabolisme de base), sur l'oxydation des substrats à jeun et sur les concentrations sanguines en acides gras libres (AGL) à jeun (table 2). L'évaluation de ces paramètres nous permettra d'appréhender, à l'échelle de l'organisme, les effets d'une surnutrition sur le métabolisme énergétique.

Afin de simplifier la lecture de la table, les études ont été classées en fonction de la durée de la surnutrition allant de la plus courte (1 jour) à la plus longue (100 jours). Certaines références sont citées plusieurs fois dans la table car elles présentent les effets d'une surnutrition à différents temps (Horton *et al.* 1995 ou encore Lê *et al.* 2006). A l'inverse, certaines références sont regroupées car elles sont issues d'une seule et même étude (Brøns *et al.* 2009; Vienberg *et al.* 2012; Jacobsen *et al.* 2012; Jacobsen *et al.* 2014 et Samocha-Bonet *et al.* 2010; Heilbronn *et al.* 2013). La table 2 présente ainsi les résultats de 18 études de surnutrition. Elle caractérise aussi chaque étude de surnutrition par :

- la quantité d'énergie en excès apportée (pourcentage d'augmentation des AEJ),
- le type de surnutrition (lipides, glucides, protéines, fructose, glucose, équilibrée)
- le pourcentage en lipides, glucides et protéines de l'alimentation suivie pendant la période de surnutrition.

Il est important de préciser que ces différentes informations ont parfois été calculées car elles n'étaient pas disponibles en l'état dans les publications. En effet, alors que certaines études présentent la composition macronutritionnelle de l'alimentation suivie pendant la période de surnutrition, d'autres ne présentent que la composition macronutritionnelle des aliments de la surnutrition. Il en est de même pour la quantité d'énergie apportée en excès, certaines références présentent l'excès calorique en pourcentage d'augmentation des AEJ, tandis que d'autres ne présentent que l'excès calorique en kcal/j. Toutes les informations de

la table ont donc été harmonisées afin de pouvoir comparer les résultats. Enfin, le type de surnutrition a été déterminé à partir des différents pourcentages en lipides, glucides et protéines de l'alimentation suivie pendant la période de surnutrition en prenant comme référence les valeurs d'une alimentation équilibrée (35-40% de lipides, 45-50% de glucides et 10-15% de protéines). Ainsi, une surnutrition est hyperlipidique pour un pourcentage en lipides supérieur à 40%, hyperglucidique pour un pourcentage en glucides supérieur à 50%, hyperprotéique pour un pourcentage en protéines supérieur à 15% et équilibrée si les pourcentages en lipides, glucides et protéines sont ceux d'une alimentation équilibrée. Il en est de même pour les surnutritons riches en fructose ou en glucose.

Quand on interprète les pourcentages en lipides, glucides et protéines de l'alimentation suivie pendant la surnutrition, il est important de toujours garder à l'esprit que même si ces pourcentages peuvent parfois paraître faibles, c'est-à-dire inférieurs aux minimums d'une alimentation équilibrée, il n'en reste pas moins que tous les besoins en macronutriments sont couverts. La seule étude de surnutrition présentée dans la table 2 qui ne couvre pas tous les besoins en macronutriments est celle de Bray *et al.* (2012) avec un pourcentage de protéines de seulement 6% (correspondant à un apport moyen de 0.68 g.kg^{-1} de poids.jour⁻¹ tandis que le minimum recommandé est de 0.8 g.kg^{-1} de poids.jour⁻¹) (Bray *et al.* 2012). Nous reviendrons par la suite sur cette étude. Intéressons-nous maintenant aux tendances globales que nous pouvons dégager de ces différentes études de surnutrition.

3.2.1 L'effet d'une surnutrition sur la dépense énergétique de repos

Certaines études de surnutrition ont montré qu'un excès calorique était capable d'induire une légère augmentation de la DER bien que d'autres n'aient pas mis en évidence d'effet. Cette légère hausse, lorsqu'elle est retrouvée, est de l'ordre de 100 à 200kcal/24h et ne semble pas être dépendante des caractéristiques de la surnutrition puisqu'une hausse de la DER est retrouvée indépendamment de :

- la **qualité** de la surnutrition (hyperlipidique (Diaz *et al.* 1992; Samocha-Bonet *et al.* 2010; Siervo *et al.* 2008; Bray *et al.* 2012; Schlögl *et al.* 2013), hyperglucidique (Horton *et al.* 1995; Minehira *et al.* 2003), hyperprotéique (Harris *et al.* 2006; Bray *et*

- al.* 2012), équilibrée (Ravussin *et al.* 1985; Dériaz *et al.* 1992) et riche en fructose (Lê *et al.* 2009)).
- la **durée** de la surnutrition (de courte durée (1 jour (Schlögl *et al.* 2013), 3 jours (D. Samocha-Bonet *et al.* 2010), 5 jours (Brøns *et al.* 2009) et 7 jours (Lê *et al.* 2009)), de moyenne durée (9 jours (Ravussin *et al.* 1985), 14 jours (Horton *et al.* 1995), 21 jours (Siervo *et al.* 2008) et 28 jours (Samocha-Bonet *et al.* 2010)) et de longue durée (42 jours (Diaz *et al.* 1992), 56 jours (Bray *et al.* 2012) et 100 jours (Dériaz *et al.* 1992)).
 - la **quantité** d'énergie apportée en surplus par la surnutrition (+20% (Siervo *et al.* 2008), +35% (Lê *et al.* 2009), +40% (Harris *et al.* 2006; Siervo *et al.* 2008; Bray *et al.* 2012), +50% (Diaz *et al.* 1992; Horton *et al.* 1995; Brøns *et al.* 2009; Samocha-Bonet *et al.* 2010), +60% (Ravussin *et al.* 1985; Siervo *et al.* 2008), +75% (Minehira *et al.* 2003) et +100% des apports énergétiques journaliers (Schlögl *et al.* 2013)).

La hausse de la DER est le plus souvent retrouvée dans les études de surnutrition de moyenne (Horton *et al.* 1995; Samocha-Bonet *et al.* 2010; Bray *et al.* 2012) et de longue durée (Diaz *et al.* 1992; Bray *et al.* 2012) en lien avec un gain de masse maigre. Il serait alors intéressant d'exprimer la DER par kg de masse maigre pour vérifier si cette hausse est toujours retrouvée. Cependant, à court terme, certains auteurs ont montré qu'une surnutrition est capable d'induire une hausse de la DER sans variation de la masse maigre (Minehira *et al.* 2003; Schlögl *et al.* 2013).

Même si un excès calorique semble induire, dans certaines conditions, une hausse de la DER, il ne faut pas oublier que cette augmentation est relativement faible par rapport à la quantité d'énergie consommée durant cette période et qu'il existe très certainement de grandes variations individuelles pouvant, en partie, expliquer que cet effet ne soit pas systématiquement retrouvé.

3.2.2 L'effet d'une surnutrition sur l'oxydation des substrats à jeun

Au delà de la dépense énergétique de repos, il est très important de connaître, dans un contexte de balance énergétique positive, la part des lipides et la part des glucides oxydés permettant le fonctionnement de l'organisme. La majorité des études de surnutrition ont montré qu'un excès calorique modifie profondément l'oxydation des substrats. En effet, de nombreuses études ont démontré une forte baisse de l'oxydation de lipides (≈ -10 à 40%)

avec une forte hausse de l'oxydation des glucides ($\approx +10$ à $+40\%$) et ce, quel que soit le type de surnutrition considérée (surnutrition hyperlipidique (Diaz *et al.* 1992; Siervo *et al.* 2008; Samocha-Bonet *et al.* 2010), hyperglucidique (Welle and Campbell 1983; Horton *et al.* 1995; Minehira *et al.* 2003), équilibrée (Ravussin *et al.* 1985), riche en fructose (Faeh *et al.* 2005; Couchepin *et al.* 2008; Lê *et al.* 2009; Ngo Sock *et al.* 2010; Lecoultré *et al.* 2014) et riche en glucose (Ngo Sock *et al.* 2010)). On aurait pu penser que la surconsommation d'un substrat entraînerait une élévation de sa propre oxydation, or une surnutrition en lipides induit les mêmes effets qu'une surnutrition en glucides à savoir une oxydation préférentielle des glucides au détriment des lipides. De même, il a été démontré qu'un excès calorique modifie de manière très rapide l'oxydation des substrats (2 jours (Ravussin *et al.* 1985), 3 jours (Samocha-Bonet *et al.* 2010), 4 jours (Minehira *et al.* 2003), 5 jours (Welle and Campbell 1983), 6 jours (Faeh *et al.* 2005; Couchepin *et al.* 2008; Lecoultré *et al.* 2014) et 7 jours (Horton *et al.* 1995; Lê *et al.* 2009; Ngo Sock *et al.* 2010)). Et cet effet semble se maintenir dans le temps (9 jours (Ravussin *et al.* 1985), 11 jours (Welle and Campbell 1983), 14 jours (Horton *et al.* 1995), 17 jours (Welle and Campbell 1983), 21 jours (Siervo *et al.* 2008) et 42 jours (Diaz *et al.* 1992)). Pour finir, la quantité d'énergie apportée en surplus par la surnutrition ne semble pas être un facteur déterminant afin d'induire une hausse de l'oxydation des glucides et une baisse de l'oxydation des lipides puisque cette modulation du métabolisme énergétique a été retrouvée dans des études apportant $+20\%$ (Siervo *et al.* 2008), $+25\%$ (Faeh *et al.* 2005), $+26\%$ (Faeh *et al.* 2005), $+30\%$ (Couchepin *et al.* 2008), $+35\%$ (Lê *et al.* 2009; Ngo Sock *et al.* 2010), $+40\%$ (Siervo *et al.* 2008), $+43\%$ (Lecoultré *et al.* 2014), $+50\%$ (Welle and Campbell 1983; Diaz *et al.* 1992; Horton *et al.* 1995; Samocha-Bonet *et al.* 2010), $+60\%$ (Ravussin *et al.* 1985; Siervo *et al.* 2008) et $+75\%$ des apports énergétiques journaliers (Minehira *et al.* 2003). Un excès de calories contribue donc à modifier l'oxydation préférentielle des substrats de l'organisme en favorisant les glucides au détriment des lipides. Cette modulation peut être considérée comme une adaptation évolutive permettant au corps humain de stocker facilement de l'énergie lorsqu'il est en condition de balance énergétique positive et ce, peu importe la durée et le macronutriment considéré.

Table 2 : Revue des études de surnutrition évaluant à jeun la dépense énergétique de repos, l'oxydation lipidique et glucidique et la concentration en acides gras libres

| Références | Augmentation des apports énergétiques journaliers (%) | Durée de la surnutrition | Type de surnutrition | Composition de l'alimentation durant la surnutrition | Dépense énergétique de repos | Oxydation lipidique | Oxydation glucidique | Concentration en acides gras libre à jeun |
|---|---|--------------------------|-----------------------------|---|------------------------------|---------------------|----------------------|---|
| Horton <i>et al.</i> , 1995 | +50% | 1 jour | Glucides | 20% lipides ; 70% glucides ; 10% protéines | ∅ | - | + | NA |
| Horton <i>et al.</i> , 1995 | +50% | 1 jour | Lipides | 53% lipides ; 37% glucides ; 10% protéines | ∅ | ∅ | ∅ | NA |
| Schlögl <i>et al.</i> , 2013 | +100% | 1 jour | Lipides | 60% lipides ; 20% glucides ; 20% protéines | + | NA | NA | NA |
| Ravussin <i>et al.</i> , 1985 | +60% | 2 jours | Equilibrée | 40% lipides ; 45% glucides ; 15% protéines | ∅ | - | + | - |
| Diewaenger <i>et al.</i> , 2000 | +40% | 3 jours | Glucides | 25% lipides ; 64% glucides ; 11% protéines | ∅ | NA | NA | - |
| Diewaenger <i>et al.</i> , 2000 | +40% | 3 jours | Lipides | 55% lipides ; 35% glucides ; 10% protéines | ∅ | NA | NA | ∅ |
| Samocha-Boneri <i>et al.</i> , 2010; Heilbronn <i>et al.</i> , 2013 | +50% | 3 jours | Lipides | 45% lipides ; 40% glucides ; 15% protéines | + | - | + | - |
| He <i>et al.</i> , 2012 | +50% | 3 jours | Protéines | 30% lipides, 50% glucides ; 20% protéines | + | NA | NA | NA |
| Mifrehiya <i>et al.</i> , 2003 | +75% | 4 jours | Glucides | 20% lipides ; 71% glucides ; 9% protéines | + | - | + | - |
| Welle <i>et al.</i> , 1983 | +50% | 5 jours | Glucides | 22% lipides ; 70% glucides ; 8% protéines | NA | - | + | NA |
| Brøns <i>et al.</i> , 2009; Jacobsen <i>et al.</i> , 2012, 2014; Venberg <i>et al.</i> , 2012 | +50% | 5 jours | Lipides | 60% lipides ; 32,5% glucides ; 7,5% protéines | + | ∅ | ∅ | - |
| Faeh <i>et al.</i> , 2005 | +25% | 6 jours | Fructose | 26% lipides ; 38% glucides ; 25% fructose ; 11% protéines | NA | - | + | - |
| Faeh <i>et al.</i> , 2005 | +25% | 6 jours | Fructose + Huile de poisson | 26% lipides ; 38% glucides ; 25% fructose ; 11% protéines | NA | - | + | - |
| Faeh <i>et al.</i> , 2005 | +26% | 6 jours | Fructose | 26% lipides ; 38% glucides ; 25% fructose ; 11% protéines | NA | - | + | - |
| Lecloultre <i>et al.</i> , 2014 | +43% | 6 jours | Fructose | 21% lipides ; 38% glucides ; 30% fructose ; 11% protéines | NA | - | + | - |
| Couchepin <i>et al.</i> , 2008 | +30% | 6 jours | Fructose | 26% lipides ; 38% glucides ; 25% fructose ; 11% protéines | ∅ (hommes) ; ∅ (femmes) | - | + | NA |
| Horton <i>et al.</i> , 1995 | +50% | 7 jours | Glucides | 20% lipides ; 70% glucides ; 10% protéines | + | - | + | NA |
| Horton <i>et al.</i> , 1995 | +50% | 7 jours | Lipides | 53% lipides ; 37% glucides ; 10% protéines | ∅ | ∅ | ∅ | NA |
| Lê <i>et al.</i> , 2006 | +18% | 7 jours | Fructose | 25% lipides ; 47% glucides ; 15% fructose ; 13% protéines | ∅ | ∅ | + | - |
| Lê <i>et al.</i> , 2009 | +35% | 7 jours | Fructose | 22% lipides ; 41% glucides ; 26% fructose ; 11% protéines | + | - | + | - |
| Ngo Sock <i>et al.</i> , 2010 | +35% | 7 jours | Fructose | 22% lipides ; 41% glucides ; 26% fructose ; 11% protéines | ∅ | - | + | - |
| Ngo Sock <i>et al.</i> , 2010 | +35% | 7 jours | Glucose | 22% lipides ; 41% glucides ; 26% fructose ; 11% protéines | ∅ | - | + | - |
| Ravussin <i>et al.</i> , 1985 | +60% | 9 jours | Equilibrée | 40% lipides ; 45% glucides ; 15% protéines | + | - | + | - |
| Welle <i>et al.</i> , 1983 | +50% | 11 jours | Glucides | 22% lipides ; 70% glucides ; 8% protéines | NA | - | + | NA |
| Horton <i>et al.</i> , 1995 | +50% | 14 jours | Glucides | 20% lipides ; 70% glucides ; 10% protéines | + | - | + | - |
| Horton <i>et al.</i> , 1995 | +50% | 14 jours | Lipides | 53% lipides ; 37% glucides ; 10% protéines | ∅ | ∅ | ∅ | - |
| Welle <i>et al.</i> , 1983 | +50% | 17 jours | Glucides | 22% lipides ; 70% glucides ; 8% protéines | NA | - | + | NA |
| Siervo <i>et al.</i> , 2008 | +40% | 21 jours | Lipides | 46% lipides ; 42% glucides ; 12% protéines | + | - | + | NA |
| Siervo <i>et al.</i> , 2008 | +40% | 21 jours | Lipides | 46% lipides ; 42% glucides ; 12% protéines | + | - | + | NA |
| Siervo <i>et al.</i> , 2008 | +60% | 21 jours | Lipides | 48% lipides ; 40% glucides ; 12% protéines | + | - | + | NA |
| Lê <i>et al.</i> , 2006 | +18% | 28 jours | Fructose | 25% lipides ; 47% glucides ; 15% fructose ; 13% protéines | ∅ | ∅ | ∅ | - |
| Samocha-Boneri <i>et al.</i> , 2010; Heilbronn <i>et al.</i> , 2013 | +50% | 28 jours | Lipides | 45% lipides ; 40% glucides ; 15% protéines | + | ∅ | ∅ | ∅ |
| Diaz <i>et al.</i> , 1992 | +50% | 42 jours | Lipides | 52% lipides ; 46% glucides ; 12% protéines | ∅ | - | + | NA |
| Bray <i>et al.</i> , 2012 | +40% | 56 jours | Lipides | 44% lipides ; 41% glucides ; 15% protéines | + | NA | NA | NA |
| Bray <i>et al.</i> , 2012 | +40% | 56 jours | Protéines | 33% lipides ; 41% glucides ; 26% protéines | + | NA | NA | NA |
| Harris <i>et al.</i> , 2006 | +40% | 56 jours | Protéines | 40% lipides ; 40% glucides ; 20% protéines | + | NA | NA | NA |
| Deriaz <i>et al.</i> , 1992; Tremblay <i>et al.</i> , 1992 | +40% | 100 jours | Equilibrée | 35% lipides ; 50% glucides ; 15% protéines | + | NA | NA | NA |

∅ : aucun effet ; - : diminution ; + : augmentation ; NA : non applicable

3.2.3 *L'effet d'une surnutrition sur la concentration en acides gras libres à jeun*

La concentration en AGL est le reflet de l'activité lipolytique du tissu adipeux. Il est donc intéressant d'évaluer l'effet d'un excès calorique sur la concentration en AGL afin d'estimer la fonction de stockage/destockage du tissu adipeux. La plupart des études de surnutrition ont montré qu'un excès calorique était à l'origine d'une baisse de la concentration circulante en acides gras libres mesurée à jeun. Cette baisse est retrouvée indépendamment de :

- la **qualité** de la surnutrition (hyperlipidique (Horton *et al.* 1995; Brøns *et al.* 2009; Samocha-Bonet *et al.* 2010), hyperglucidique (Horton *et al.* 1995; Dirlewanger *et al.* 2000; Minehira *et al.* 2003), équilibrée (Ravussin *et al.* 1985), riche en fructose (Faeh *et al.* 2005; Lê *et al.* 2006; Couchepin *et al.* 2008; Lê *et al.* 2009; Ngo Sock *et al.* 2010; Lecoultre *et al.* 2014) et riche en glucose (Ngo Sock *et al.* 2010))
- la **durée** de la surnutrition (2 jours (Ravussin *et al.* 1985), 3 jours (Dirlewanger *et al.* 2000; Samocha-Bonet *et al.* 2010), 4 jours (Minehira *et al.* 2003), 5 jours (Brøns *et al.* 2009), 6 jours (Faeh *et al.* 2005; Couchepin *et al.* 2008; Lecoultre *et al.* 2014), 7 jours (Lê *et al.* 2006, 2009; Ngo Sock *et al.* 2010), 9 jours (Ravussin *et al.* 1985), 14 jours (Horton *et al.* 1995) et 28 jours (Lê *et al.* 2006))
- la **quantité** d'énergie apportée en surplus par la surnutrition (+18% (Lê *et al.* 2006), +25% (Faeh *et al.* 2005), +26% (Faeh *et al.* 2005), +30% (Couchepin *et al.* 2008), +35% (Lê *et al.* 2009; Ngo Sock *et al.* 2010), +40% (Dirlewanger *et al.* 2000), +43% (Lecoultre *et al.* 2014), +50% (Horton *et al.* 1995; Brøns *et al.* 2009; Samocha-Bonet *et al.* 2010), +60% (Ravussin *et al.* 1985) et +75% des apports énergétiques journaliers (Minehira *et al.* 2003))

En condition de surnutrition, la baisse de la concentration en AGL est donc le témoin d'une inhibition de la lipolyse par le tissu adipeux, ce qui est cohérent avec la prise de masse grasse observée. En effet, à jeun, le tissu adipeux permet la fourniture à l'organisme de l'énergie nécessaire à sa survie, grâce au processus complexe et finement régulé qu'est la lipolyse. Elle permet l'hydrolyse des triglycérides contenus dans la gouttelette lipidique des adipocytes en diglycérides, puis monoglycérides afin de former des acides gras et du

glycérol. La lipolyse est un phénomène finement régulé par de multiples signaux d'origine nerveuse, endocrine ou paracrine, qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques. La régulation de la lipolyse est détaillée dans l'annexe 7 qui aborde plus spécifiquement le rôle du tissu adipeux.

Comme nous l'avons vu précédemment, d'après Randle et McGarry, les AGL et le glucose sont en compétition permanente et exercent l'un sur l'autre une pression quant à leur devenir cellulaire, entre stockage et oxydation. Ainsi, une baisse de la concentration en AGL peut contribuer à exercer une moins forte pression sur le métabolisme glucidique pouvant expliquer en partie la modulation de la balance oxydative. De plus, la baisse de l'oxydation lipidique est aussi très certainement dû à une modification des acteurs régulant l'orientation des substrats au niveau cellulaire et, plus particulièrement, au niveau musculaire.

Nous allons donc maintenant nous intéresser à deux voies clés régulant le métabolisme énergétique en fonction des niveaux énergétiques de la cellule, à savoir la voie de l'AMPK et la voie de la sirtuine 1/peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 alpha (SIRT1/PGC1 α).

3.3 Les acteurs moléculaires de l'orientation métabolique

Il existe au niveau cellulaire des protéines dont l'expression et l'activité varient en fonction du statut énergétique de la cellule, c'est notamment le cas de l'AMPK et de SIRT1 (silent mating type information regulation 2 homologue 1) (Cantó *et al.* 2009). Ces deux protéines, sensibles aux ratios AMP/ATP et NAD⁺/NADH (respectivement), sont considérées comme des senseurs énergétiques cellulaires et permettent d'adapter le fonctionnement de la cellule en fonction de différentes situations telles que l'exercice physique, le jeûne ou encore la surnutrition. On peut ainsi considérer que ces deux protéines sont des chefs d'orchestre permettant d'adapter et de coordonner l'activité des protéines et l'expression des gènes liés au métabolisme énergétique. Les effets de ces protéines ont été largement étudiés dans des situations où elles sont activées comme en condition de restriction calorique ou à l'aide de composés augmentant leurs activités comme les polyphénols. Nous verrons tout d'abord l'importance de la voie SIRT1/PGC1 α et détaillerons comment SIRT1 et l'AMPK peuvent s'activer l'une l'autre.

3.3.1 SIRT1

SIRT1, faisant partie de la famille des sirtuines, a tout d'abord été identifiée chez la levure sous le nom de Sir2 et a suscité beaucoup d'intérêt puisqu'elle est capable, lorsqu'elle est sur-exprimée, d'augmenter la durée de vie des levures (Kaeberlein *et al.* 1999). Il existe chez l'Homme 7 isoformes de sirtuines (de SIRT1 à SIRT7). SIRT1 est majoritairement localisée dans le noyau bien que dans certaines situations elle puisse être retrouvée au niveau cytoplasmique (Houtkooper *et al.* 2012).

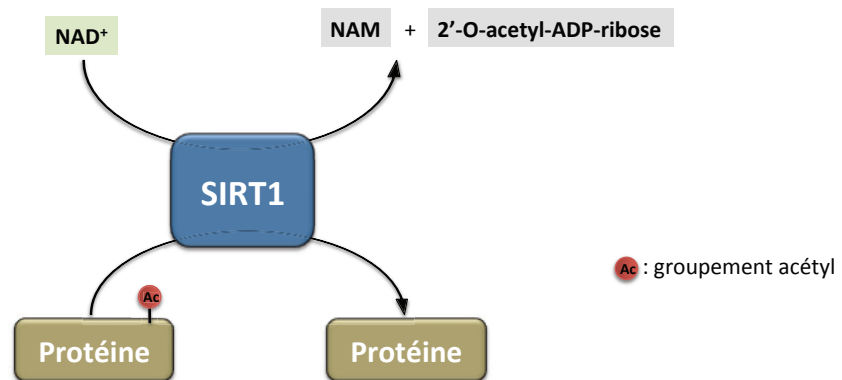


Figure 22 : Réaction de déacétylation catalysée par SIRT1

Comme illustré dans la figure 22, SIRT1 est une protéine déacétylase NAD^+ dépendante capable de déacétyler une autre protéine en consommant du NAD^+ et en libérant une molécule de nicotinamide (NAM) et de 2'-O-acétyl-ribose (Grubisha *et al.* 2005).

La fonction principale de SIRT1 est de coordonner l'expression de nombreux gènes nécessaire à l'adaptation du métabolisme face à une restriction calorique au travers de l'acétylation d'histones, de facteurs et co-facteurs transcriptionnels. En condition de restriction calorique, l'activation de SIRT1 aboutit à une augmentation de la biogénèse mitochondriale, une augmentation des capacités oxydatives, une augmentation de l'oxydation des lipides et une inhibition de la glycolyse (Houtkooper *et al.* 2012). Nous allons maintenant détailler par quel mécanisme SIRT1 est activée et comment elle est capable d'induire une telle réponse au niveau cellulaire.

3.3.2 Régulation de l'expression de SIRT1

SIRT1 est régulée au niveau transcriptionnel par de nombreux facteurs de transcription comme forkhead box O1 (FOXO1), CRE-binding protein (CREB), carbohydrate

responsive element-binding protein (CHREBP) et peroxysomes proliferator-activated receptors (PPARs) qui ont la capacité de se fixer dans la région promotrice du gène de SIRT1 (Houtkooper *et al.* 2012). Comme nous le détaillerons par la suite, ces facteurs de transcription sont aussi eux-mêmes régulés par SIRT1.

3.3.3 Régulation de l'activité de SIRT1

a) Le cofacteur NAD⁺

C'est la dépendance de SIRT1 vis-à-vis du NAD⁺ qui lui confère son statut de senseur énergétique. Le niveau en NAD⁺ et, plus spécifiquement, le ratio NAD⁺/NADH est le reflet du statut énergétique de la cellule. En effet, la concentration intracellulaire en NAD⁺ est fonction de sa formation et de sa dégradation. Le NAD⁺ peut être formé à partir du NAM sous l'action successive de la nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) et de la nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT) ou être issu de l'oxydation du NADH au niveau de la chaîne respiratoire. A l'inverse, le NAD⁺ est utilisé pour former du NADH dans les réactions cataboliques libérant de l'énergie. Le ratio NAD⁺/NADH est donc modulé par le statut nutritionnel et par l'activité physique. Ainsi, une restriction calorique, un jeûne ou encore un exercice, augmente le ratio NAD⁺/NADH favorisant l'activité de SIRT1 tandis qu'à l'inverse une surnutrition diminue le ratio NAD⁺/NADH pouvant inhiber l'activité de SIRT1 (Houtkooper *et al.* 2010).

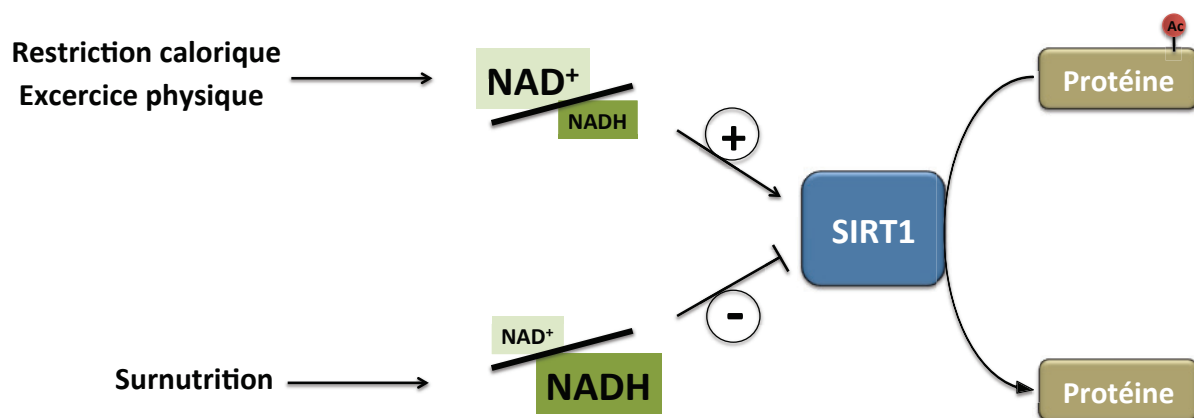


Figure 23 : Modulation de l'activité de SIRT1 par le ratio NAD⁺/NADH

b) L'AMPK

L'AMPK est une protéine kinase dont l'activité est régulée par le ratio AMP/ATP, ayant la capacité de phosphoryler un grand nombre de protéines liées à la régulation du

métabolisme énergétique. En général, l'activation de l'AMPK a pour but de maintenir les réserves énergétiques de la cellule en activant les voies cataboliques qui produisent de l'ATP tout en éteignant les voies anaboliques qui consomment de l'ATP (Hardie and Ashford 2014). L'activation de l'AMPK est retrouvée dans des situations de stress métabolique comme la restriction calorique ou encore l'exercice physique, toutes deux aboutissant à une augmentation du ratio AMP/ATP. La plupart du temps, l'activation de cette voie augmente le métabolisme oxydatif et la biogenèse mitochondriale (Hardie and Ashford 2014). Comme nous l'avons vu précédemment l'AMPK est, par exemple, capable de phosphoryler l'ACC, la rendant ainsi inactive, ce qui contribue à orienter le métabolisme vers l'oxydation des lipides, c'est l'inverse pour MLYCD, à savoir sa phosphorylation augmente son activité (Brownsey *et al.* 2006; Fediuc *et al.* 2006). L'AMPK et SIRT1 peuvent aussi s'activer l'une l'autre, avec d'un côté l'AMPK qui stimule l'activité de SIRT1 en phosphorylant la NAMPT, enzyme limitante de la formation de NAD^+ à partir de NAM et d'un autre côté SIRT1 qui active l'AMPK en déactylant la serine/threonine kinase 11 (LKB1) qui pourra alors stimuler l'activité de l'AMPK par phosphorylation.

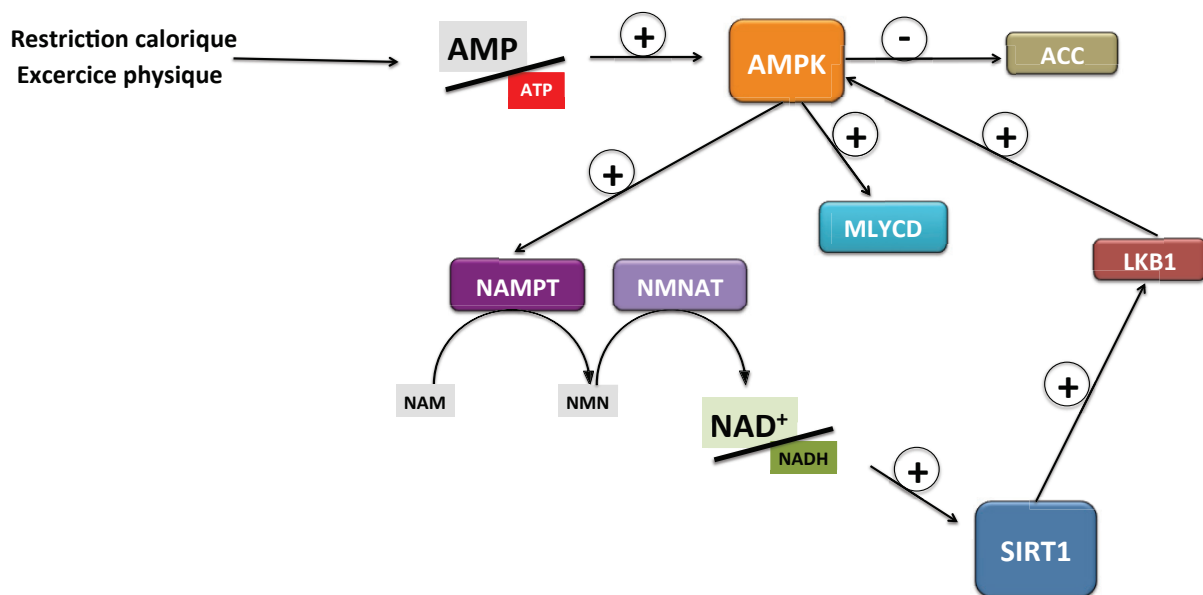


Figure 24 : Régulation de l'activité de l'AMPK par le ratio AMP/ATP et le lien avec l'activation de SIRT1

La modulation de l'activité de l'AMPK contribue donc, d'une manière directe, à orienter le métabolisme énergétique par son action sur l'ACC et MLYCD favorisant ainsi l'oxydation des

lipides ou des glucides et contribue, d'une manière indirecte, à réguler le métabolisme énergétique par la modulation de l'activité de SIRT1 via son action sur la NAMPT. Ainsi l'AMPK joue un rôle primordial dans la réponse cellulaire face à un exercice et une restriction calorique et on peut facilement envisager que son inactivation, en période de surnutrition, puisse être en partie à l'origine de la baisse de l'oxydation des lipides et la hausse de l'oxydation de glucides.

- **Les polyphénols**

Les polyphénols, et notamment le resvératrol, sont bien connus pour mimer l'effet d'une restriction calorique et augmenter la durée de vie de la levure par exemple (Howitz *et al.* 2003). Chez la souris, Lagouge *et al.* ont montré que la prise de resvératrol est capable de lutter contre les effets délétères d'un régime riche en lipides. Les auteurs ont ainsi mis en évidence que la supplémentation en resvératrol chez des souris soumises à un régime riche en lipides permet d'induire une sur-expression et une augmentation de la quantité en protéine de PGC1 α . De plus, ils ont mis en évidence que PGC1 α se trouve alors sous sa forme active déacétylée au niveau du muscle squelettique, ce qui explique très certainement l'augmentation de l'expression de NRF1 (Nuclear Respiratory Factor 1) et TFAM (Transcription Factor A Mitochondrial). En lien avec ces résultats moléculaires, Lagouge *et al.* démontrent aussi que les souris recevant du resvertrol possèdent une capacité oxydative et une biogénèse mitochondriale plus importante que les souris contrôles. Ces auteurs ont été les premiers à démontrer le rôle potentiel thérapeutique du resvératrol dans la lutte contre les effets délétères d'un régime riche en graisse. De même, Chen *et al.* ont démontré chez le rat que le resvératrol active SIRT1 et lutte contre les effets délétères d'un régime riche en graisse en favorisant l'oxydation des lipides au niveau du muscle squelettique par une sur-expression de gènes liés au transport des lipides (FAT/CD36) et à la β -oxydation (Chen *et al.* 2011). Bien que les polyphénols puissent avoir un effet direct sur l'activation de la voie SIRT1/PGC1 α , les polyphénols contribueraient aussi à activer la voie SIRT1/PGC1 α par le biais de l'activation de l'AMPK (Cantó *et al.* 2010). L'activation de la voie SIRT1/PGC1 α joue alors un rôle essentiel dans l'augmentation de la biogénèse mitochondriale, associée à l'oxydation préférentielle des lipides au détriment des glucides.

3.3.4 Les cibles de SIRT1

SIRT1 est connu pour pouvoir déacétyler les histones H3 et H4 et ainsi favoriser le relâchement de la chromatine permettant l'expression de gènes (Imai *et al.* 2000). De plus, SIRT1 orchestre aussi la régulation de l'expression de nombreux gènes par déacétylation de certains facteurs ou cofacteurs de transcription (Haigis and Sinclair 2010). En effet, SIRT1 est capable de déacétyler de nombreux facteurs ou cofacteurs de transcription indispensables à la régulation de l'expression des gènes du métabolisme lipidique et glucidique dont les plus importants sont PGC1 α , sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1c), FOXO1 et FOXO3 (Houtkooper *et al.* 2012). Ainsi SIRT1 est impliqué dans de nombreux processus comme l'inflammation, l'apoptose, la sénescence, le métabolisme lipidique et glucidique. Nous allons maintenant nous intéresser tout particulièrement à PGC1 α .

- **PGC1 α**

Comme nous l'avons vu précédemment la sur-expression de PGC1 α et/ou l'activation de PGC1 α contribue à augmenter le nombre et la taille des mitochondries en lien avec une capacité oxydative plus importante que ce soit *in vitro* sur des myotubes (Wu *et al.* 1999) ou chez des souris (Lagouge *et al.* 2006). Wu *et al.* ont par exemple montré que la sur-expression de PGC1 α augmente l'expression de gènes liés à la mitochondrie et à la chaîne respiratoire dont certains sont encodés par le génome nucléaire comme UCP2, l'ATP synthétase et COX IV et certains sont encodés par le génome mitochondrial comme COX II et CytC. Ils ont démontré que PGC1 α se lie et active NRF1. NRF1 est connu pour activer la transcription de nombreux gènes de la chaîne respiratoire et de favoriser la biogénèse mitochondriale en augmentant l'expression de TFAM (Scarpulla 1997; Scarpulla *et al.* 2012). TFAM est capable d'activer directement la replication et la transcription du génome mitochondrial (Virbasius and Scarpulla 1994). De même, Gerhart-Hines *et al.* ont démontré que la sur-expression de PGC1 α dans des myotubes augmente l'expression du facteur de transcription ERR α , de gènes liés à la mitochondrie (CytC et COXVA) et de gènes liés à l'utilisation des lipides (MCAD, CPT1B et PDK4). Ils ont aussi démontré que l'activation de PGC1 α est sous la dépendance de SIRT1 (Gerhart-Hines *et al.* 2007). L'activation de la voie SIRT1/PGC1 α contribue aussi notamment à favoriser l'oxydation des lipides au détriment des glucides que ce soit sur des myotubes en culture (Gerhart-Hines *et al.* 2007) ou chez l'animal (Lagouge *et al.* 2006) par l'utilisation de polyphénols. Les travaux de Gerhart-Hines

montrent aussi que SIRT1 diminue l'oxydation du glucose, d'une part en inhibant la PFK et la PK et d'autre part en activant PGC1 α qui augmente l'expression de PDK4 (Wende *et al.* 2005; Gerhart-Hines *et al.* 2007).

La figure 25 récapitule ainsi les effets de l'activation de la voie SIRT1/PGC1 α sur l'expression des gènes d'une cellule musculaire.

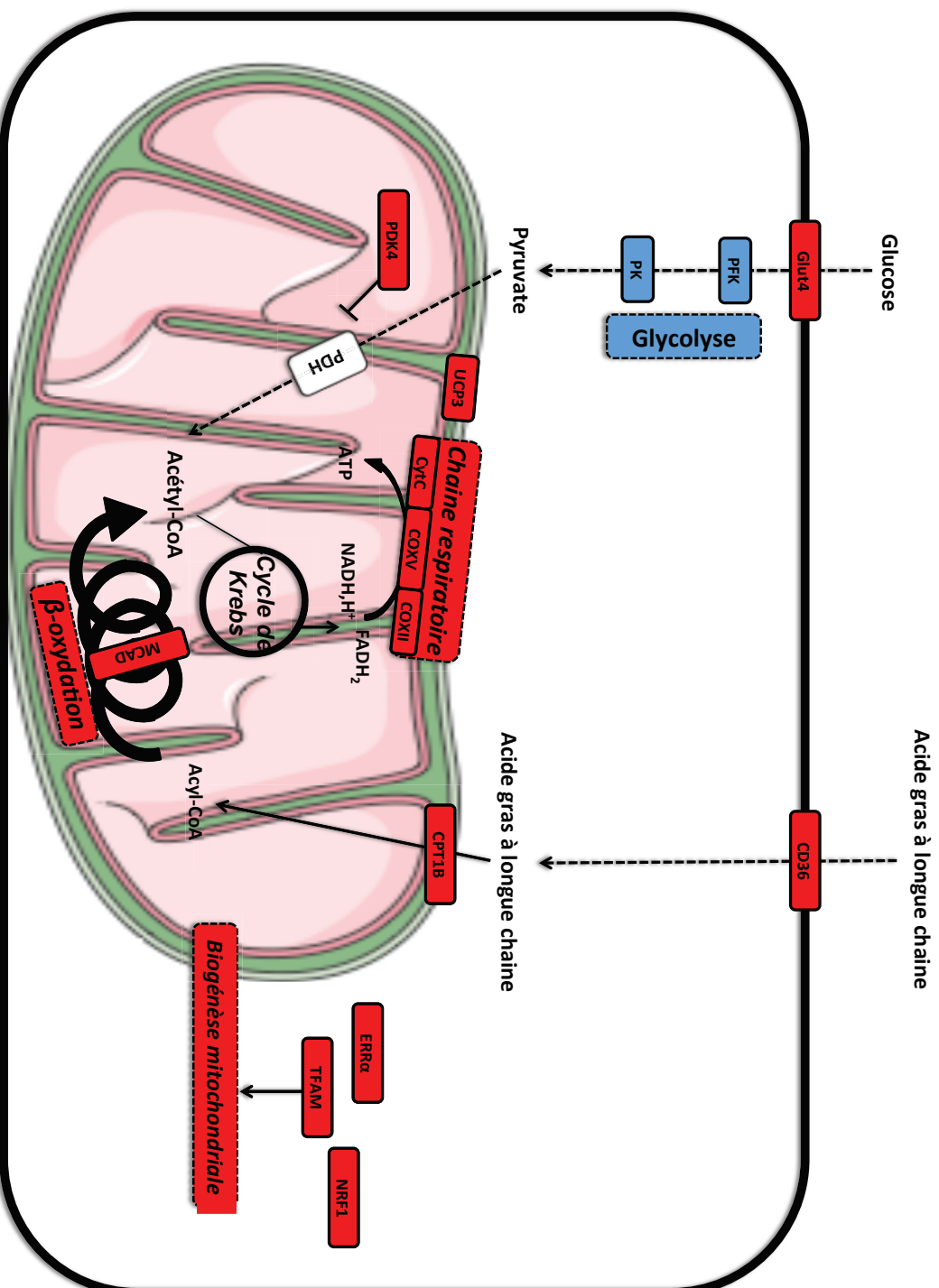


Figure 25 : Régulation de l'expression des gènes liés au métabolisme par SIRT1 au niveau musculaire. En rouge les gènes sont sur-exprimés et en bleu les gènes sont sous-exprimés par SIRT1

Chapitre 2 : Hypothèses et objectifs

L'obésité est un problème majeur de santé publique de par les complications cardio-métaboliques qu'elle induit. Il est important de bien comprendre les mécanismes mis en jeu lors de son établissement et de trouver un potentiel traitement permettant d'endiguer ces complications. Les modèles de surnutrition sont, sans nul doute, les plus à même d'identifier les mécanismes initiaux contribuant, durant une période de balance énergétique positive, à des anomalies métaboliques autrement dit à une dérégulation du métabolisme. De même, les modèles de surnutrition, associés à la prise d'un traitement nous permettent d'identifier si celui-ci est capable de contrecarrer les effets délétères d'une balance énergétique positive.

Bien que de nombreux organes comme le foie, le tissu adipeux ou encore l'intestin soient impliqués dans le développement de l'obésité, le muscle squelettique joue un rôle prépondérant dans la mise en place des anomalies. Le muscle squelettique est un organe qui consomme une grande quantité de substrats énergétiques, que ce soit des protéines, des lipides et des glucides. Oxydant majoritairement des lipides et/ou des glucides pour son fonctionnement, le muscle squelettique peut alors être vu comme un organe régulant indirectement les flux de lipides et de glucides disponibles pour le stockage.

Comprendre les effets d'une balance énergétique positive sur le muscle squelettique est indispensable pour identifier des cibles thérapeutiques permettant de développer de nouveaux traitements.

Notre premier objectif a été de comprendre les effets d'une surnutrition lipidique de 56 jours sur les adaptations du muscle squelettique en associant l'étude de la régulation de l'expression des gènes et l'étude de la fonction mitochondriale. Notre hypothèse était qu'une surnutrition était capable, au niveau de muscle squelettique, de diminuer le ratio $NAD^+/NADH$ contribuant à inactiver la voie SIRT1/PGC1 α et donc moduler le métabolisme énergétique vers l'oxydation des glucides au détriment des lipides tout en réduisant la biogénèse mitochondriale.

Le second objectif a été de comprendre les effets d'une surnutrition riche en fructose de 7 jours sur l'expression génique du muscle squelettique chez des sujets apparentés diabétiques de type 2. Nous avons aussi souhaité identifier par quel mécanisme le fructose était capable de modifier l'expression génique du muscle squelettique et d'identifier *in vitro* par quel biais le fructose pouvait induire ces effets.

Le dernier objectif a été d'élaborer un nouveau projet de surnutrition afin d'identifier si la prise de polyphénols, à des doses physiologiques (2g/j), serait capable de contrecarrer les effets délétères d'une surnutrition hyperglucidique hyperlipidique chez des sujets sains. Dans cette étude nous avons souhaité investiguer la plupart des acteurs contribuant à la régulation de la sensibilité à l'insuline, afin d'identifier en détails les mécanismes d'actions des polyphénols.

Chapitre 3 : Matériels et méthodes

1. Design des études

Nous allons présenter trois études de surnutrition évaluant l'impact d'une balance énergétique positive chez des sujets volontaires sains. Ces trois études diffèrent en durée (7, 31 et 56 jours) et en type de surnutrition (fructose, glucides/lipides et lipides).

D'une manière générale, une étude de surnutrition se décompose en deux périodes, une période basale et une période de surnutrition. La période basale consiste à étudier les sujets dans une situation normale, c'est-à-dire dans une situation de balance énergétique équilibrée. A l'inverse, la période de surnutrition nous permet d'étudier les sujets dans une situation d'excès calorique. Chaque sujet est donc son propre témoin, et en comparant les tests réalisés durant ces deux périodes, nous pouvons ainsi évaluer les effets de la surnutrition.

En pratique, durant la période basale de nombreux tests sont réalisés au cours de différentes journées. Il est ainsi nécessaire que les sujets conservent, tout au long de cette période, un poids stable afin d'obtenir des données homogènes et interprétables. Pour cela, il existe deux méthodes, la plus simple est de demander aux sujets de ne pas modifier leur alimentation et habitude de vie, en leur conseillant de ne pas faire d'excès alimentaire et de ne pas pratiquer d'activité physique intense. La seconde méthode consiste à fournir aux sujets tous les repas qu'ils prendront durant cette période, en ayant au préalable évalué les besoins énergétiques de chaque sujet afin d'adapter les apports mais aussi en prenant en compte les goûts et aversions de chacun. Cette seconde méthode, beaucoup plus onéreuse, nécessite une logistique conséquente (régime contrôlé).

Nous allons maintenant présenter le design des trois études de surnutrition sur lesquelles mon travail de thèse a porté. Nous commencerons par présenter les deux études terminées sur lesquelles l'analyse de données a été réalisée. Puis, nous présenterons la nouvelle étude de surnutrition que j'ai conduite et qui est actuellement en cours. La figure 26 illustre, d'une manière globale, les trois projets de surnutrition.

L'étude de surnutrition hyperlipidique correspond à un excès calorique fixe de +757kcal/j pour tous les sujets. En revanche, les deux autres études de surnutrition ont un excès calorique adapté en fonction des besoins de chaque sujet, c'est pourquoi l'excès calorique est exprimé en pourcentage des besoins énergétiques.

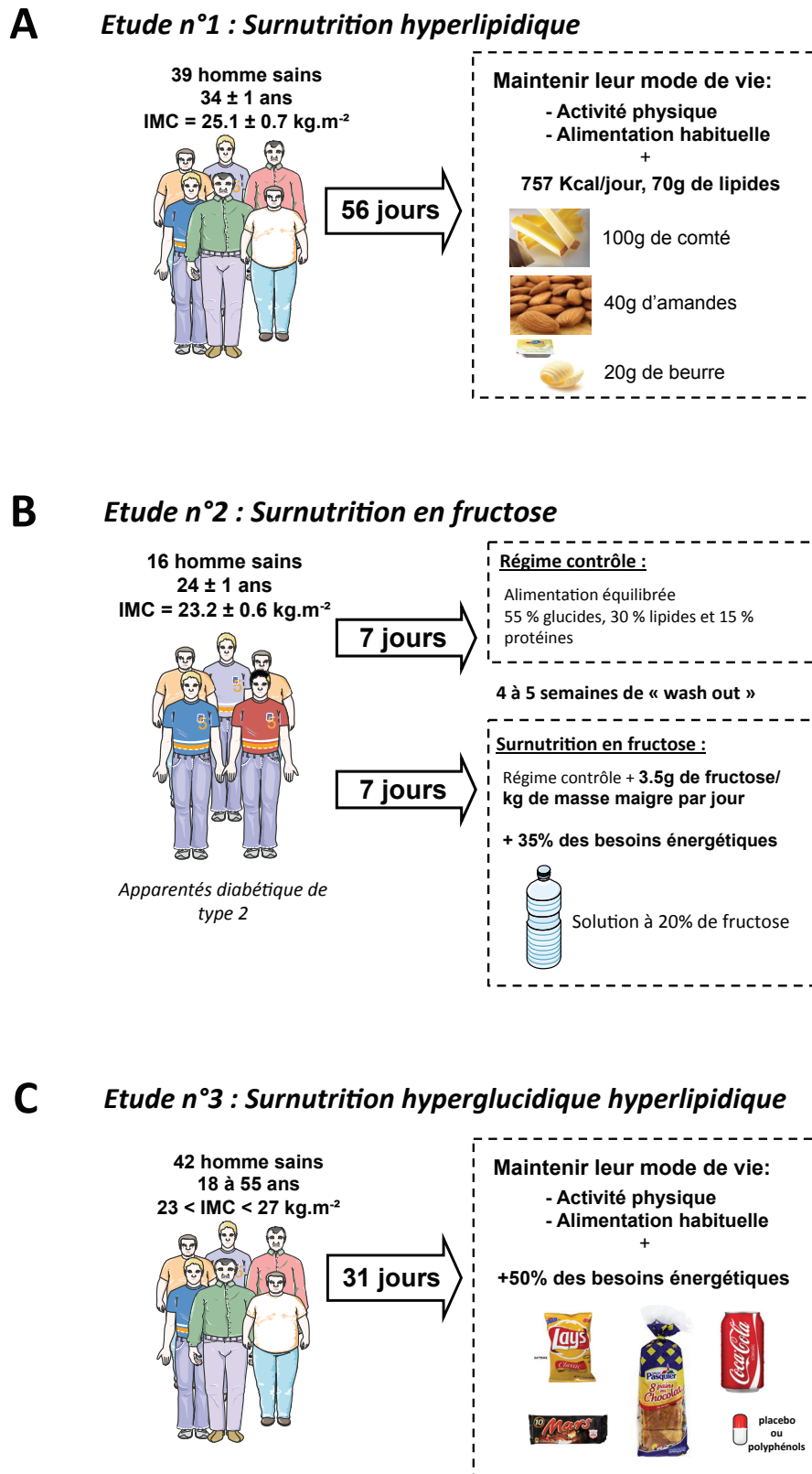


Figure 26 : Schéma général des études. (A) Etude n°1 (surnutrition hyperlipidique), (B) Etude n°2 (surnutrition en fructose) et (C) Etude n°3 (surnutrition hyperglucidique hyperlipidique)

1.1 Etude n°1 : la surnutrition hyperlipidique

Il s'agit d'une étude longitudinale prospective, sans bénéfice direct, réalisée en ouvert, se déroulant sur 56 jours consécutifs (de J0 à J56). Ce projet de surnutrition hyperlipidique (+757 kcal/jour) a été réalisé par le Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, basé à Lyon, en collaboration avec le Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, basé à Clermont-Ferrand. Le design de l'étude est illustré dans la figure 28. Nous reviendrons plus tard en détails sur chacun des paramètres mesurés et les méthodes utilisées.

L'étude est approuvée par le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) de Lyon et est en accord avec la déclaration d'Helsinki II et la loi française Huriot-Serusclet. Ce protocole est enregistré sur le site clinicaltrials.gov (NCT00905892).

Au total, le CRNH de Lyon a recruté 24 sujets et le CRNH de Clermont-Ferrand a lui aussi recruté 24 sujets. Néanmoins comme illustré ci-dessous, l'analyse de cette étude a été réalisée sur 39 sujets (figure 27).

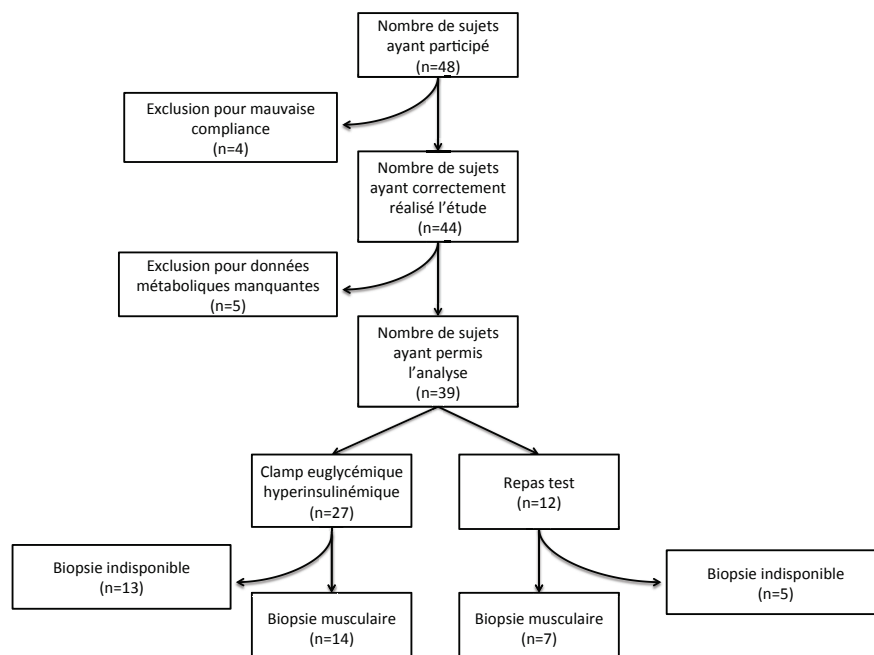


Figure 27 : Flow chart de l'étude

Cette étude bicentrique a été possible grâce à la standardisation du déroulement des journées d'exploration et des méthodes de prélèvements. De plus, la centralisation des

analyses biologiques et géniques nous a permis de considérer les sujets comme un groupe homogène quel que soit le centre d'investigation

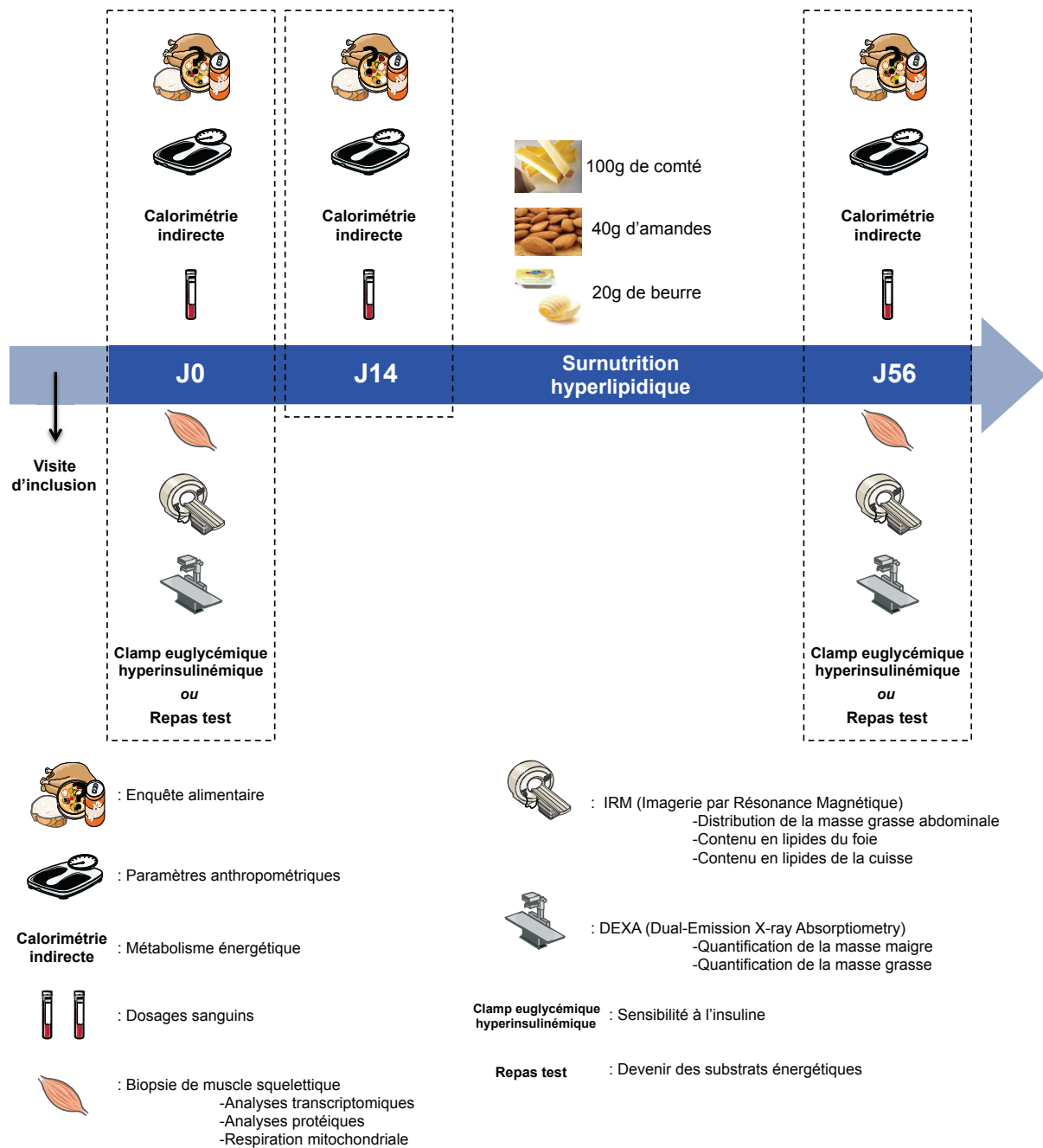


Figure 28 : Design des journées d'exploration métabolique de l'étude n°1

1.2 Etude n°2 : la surnutrition en fructose

Le projet de surnutrition en fructose (+35% des besoins énergétiques) a été réalisé par l'équipe du Dr. Luc Tappy, basée au Centre Hospitalier Universtaire Vaudois (CHUV), à Lausanne. Il s'agit d'une étude randomisée croisée sans bénéfice direct réalisée en ouvert, et se déroulant sur deux périodes de 7 jours consécutifs, espacées d'au moins 4 à 5 semaines. Le desgin est présenté dans la figure 29 ci-dessous. Cette étude est enregistrée sur le site clinicaltrials.gov (NCT00523562) et a été acceptée par le comité d'éthique de l'Université de médecine de Lausanne.

Durant les 3 jours précédents les journées d'exploration métabolique (J7), les sujets ont consommé chez eux des repas fournis par le centre. Ces repas permettent de s'assurer d'une alimentation équilibrée en macronutriments et en quantité d'énergie pour chaque sujet. En revanche, cela nécessite une évaluation fine des besoins énergétiques journaliers de chaque sujet afin d'adapter la quantité d'énergie fournie.

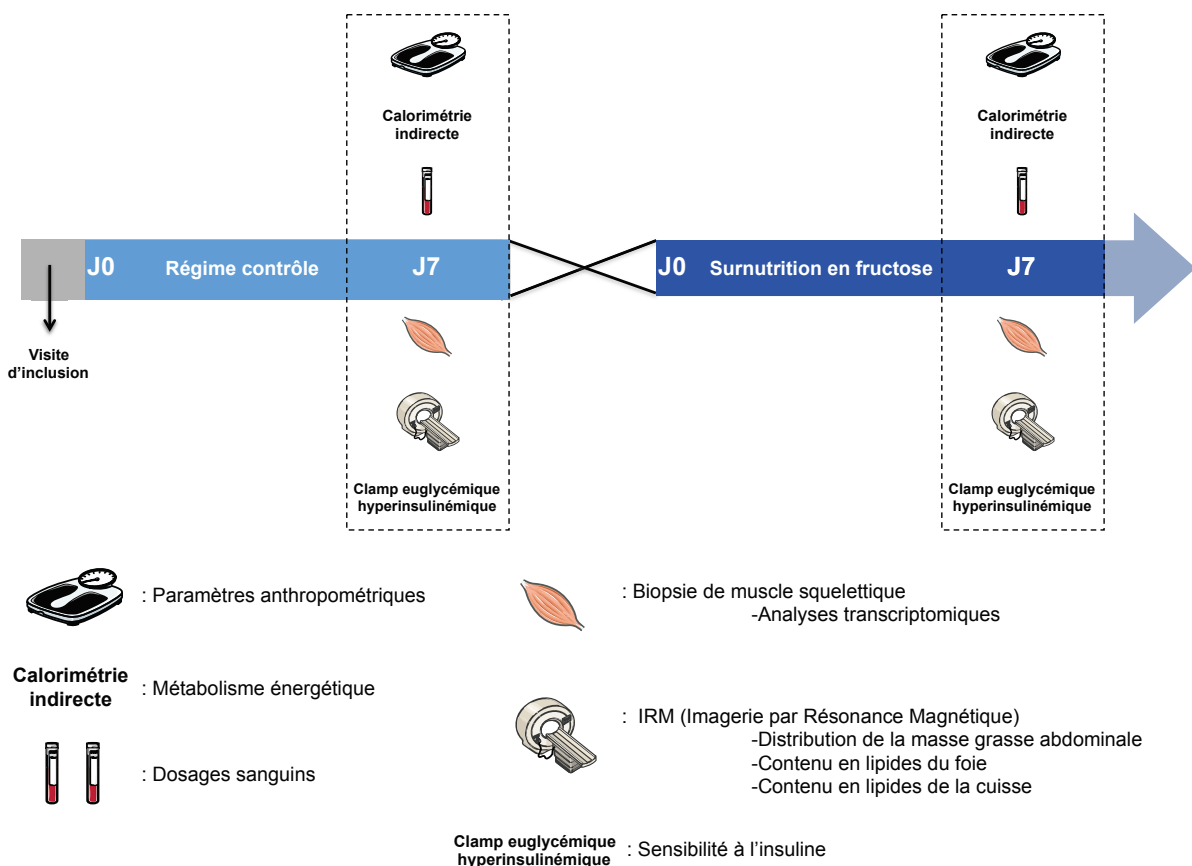


Figure 29 : Design des journées d'exploration métabolique de l'étude n°2

1.3 Etude n° 3 : la surnutrition hyperglucidique hyperlipidique

Ce projet de surnutrition hyperglucidique hyperlipidique (+50 des besoins énergétiques) surnommé « Poly-Nut » est une étude actuellement en cours au Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes. Il s'agit d'une étude longitudinale randomisée prospective sans bénéfice direct en groupes parallèles, en double aveugle polyphénols *versus* placebo, sur 39 jours consécutifs (de J-7 à J31). Le design des journées de l'étude est illustré dans la figure 30 ci-dessous.

L'étude est approuvée par le Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) de Lyon et est en accord avec la déclaration d'Helsinki II et la loi française Huriet-Serusclet. Ce protocole est enregistré sur le site clinicaltrials.gov (NCT02145780).



Figure 30 : Design des journées d'exploration métabolique de l'étude n°3

2. Les surnutritions

D'une manière générale, tous les aliments des surnutritions sont fournis gratuitement par les centres de recherche pendant toute la durée de l'étude, conditionnés en portions journalières. Les aliments de la surnutrition sont consommés en plus de l'alimentation habituelle des sujets ou en plus du régime contrôlé dans le cas de l'étude de surnutrition en fructose.

2.1 La surnutrition hyperlipidique (étude n°1)

La surnutrition hyperlipidique correspond à un excès calorique fixe de +757kcal/j apportée par 100 g de comté, 40 g d'amandes (non grillés et non salés) et 20 g de beurre. La composition macronutritionnelle des aliments de la surnutrition est présentée dans la table 3 ci-dessous. Les sujets ont consommé ces aliments en plus de leur alimentation habituelle.

Table 3 : Composition macronutritionnelle de la surnutrition hyperlipidique

| Aliments | Quantité (g) | Protéines (g) | Glucides (g) | Lipides (g) | dont Saturés (g) | dont Poly-insaturés (g) | dont Mono-insaturés (g) | Energie (kcal) |
|-----------------------|--------------|---------------|--------------|-------------|------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| Comté | 100 | 29.4 | 0.0 | 28.8 | 17.3 | 1.0 | 8.9 | 377 |
| Amande | 40 | 7.6 | 1.8 | 21.4 | 1.7 | 4.0 | 14.6 | 230 |
| Beurre | 20 | 0.1 | 0.1 | 16.6 | 10.5 | 0.4 | 4.7 | 150 |
| Total | | 37.1 | 1.9 | 66.8 | 29.5 | 5.4 | 28.2 | 757 |
| % de l'énergie | | 20% | 1% | 79% | | | | |

La surnutrition commence dès J0 (à la suite de la journée d'exploration métabolique) et se termine à J55 (J56 étant une journée d'exploration métabolique). La surnutrition a aussi été consommée lors de la journée d'exploration J14 (à la suite de l'exploration métabolique). Au total, les sujets ont donc été surnourris durant 56 jours.

2.2 La surnutrition en fructose (étude n°2)

La surnutrition en fructose correspond à un excès calorique de +35% des besoins énergétiques apportée par une solution de 20% en fructose. La quantité de fructose apportée pour chaque sujet a été calculée à partir de la masse maigre des sujets. Les sujets ont reçu 3,5g de fructose par kg de masse maigre par jour. La surnutrition en fructose commence dès J0 et se termine à J6. Au total, les sujets ont été surnourris durant 7 jours.

2.3 La surnutrition hyperlipidique hyperglucidique (étude n°3)

La surnutrition hyperglucidique hyperlipidique correspond à un excès calorique de +50% des besoins énergétiques apporté par des chips, des pains au chocolat, des mars et du coca-cola. Le nombre de chaque aliment de cette surnutrition a été adapté en fonction des besoins énergétiques de chaque sujet. Les besoins énergétiques de chaque sujet sont calculés à l'aide de mesure de calorimétrie indirecte à jeun en appliquant un facteur de niveau d'activité physique de 1,6 (niveau moyen).

Pour des raisons pratiques, nous ne pouvons pas ajuster la surnutrition au gramme près, c'est pourquoi, nous avons défini 4 surnutritions types dont les pourcentages en protéines, lipides et glucides sont similaires et présentés dans la table 4 ci-dessous.

Table 4 : Composition macronutritionnelle des 4 surnutritions hyperglucidique hyperlipidique

| Aliments | Nombre d'unité | Quantité (g) | Protéines (g) | Glucides (g) | Lipides (g) | dont Saturés (g) | dont Poly-insaturés (g) | dont Mono-insaturés (g) | Energie (kcal) |
|-----------------------|----------------|--------------|---------------|--------------|-------------|------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| pain au chocolat | 1 | 45 | 3.2 | 20.8 | 10.5 | 6.6 | 0.7 | 3.2 | 190 |
| mars | 1 | 42 | 1.5 | 29.5 | 7.2 | 3.5 | 0.4 | 3.2 | 189 |
| coca-cola | 2 | 660 | 0.0 | 72.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 290 |
| chips | 2 | 50 | 3.3 | 27.0 | 17.0 | 1.8 | 1.8 | 13.5 | 274 |
| Total | | | 7.9 | 149.9 | 34.7 | 11.9 | 2.8 | 19.8 | 944 |
| % de l'énergie | | | 3% | 64% | 33% | | | | |

| Aliments | Nombre d'unité | Quantité (g) | Protéines (g) | Glucides (g) | Lipides (g) | dont Saturés (g) | dont Poly-insaturés (g) | dont Mono-insaturés (g) | Energie (kcal) |
|-----------------------|----------------|--------------|---------------|--------------|-------------|------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| pain au chocolat | 1 | 45 | 3.2 | 20.8 | 10.5 | 6.6 | 0.7 | 3.2 | 190 |
| mars | 2 | 84 | 3.0 | 59.0 | 14.4 | 7.0 | 0.8 | 6.3 | 378 |
| coca-cola | 2 | 660 | 0.0 | 72.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 290 |
| chips | 2 | 50 | 3.3 | 27.0 | 17.0 | 1.8 | 1.8 | 13.5 | 274 |
| Total | | | 9.4 | 179.4 | 41.9 | 15.3 | 3.3 | 23.0 | 1133 |
| % de l'énergie | | | 3% | 63% | 33% | | | | |

| Aliments | Nombre d'unité | Quantité (g) | Protéines (g) | Glucides (g) | Lipides (g) | dont Saturés (g) | dont Poly-insaturés (g) | dont Mono-insaturés (g) | Energie (kcal) |
|-----------------------|----------------|--------------|---------------|--------------|-------------|------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| pain au chocolat | 2 | 90 | 6.3 | 41.7 | 21.0 | 13.2 | 1.4 | 6.4 | 381 |
| mars | 2 | 84 | 3.0 | 59.0 | 14.4 | 7.0 | 0.8 | 6.3 | 378 |
| coca-cola | 2 | 660 | 0.0 | 72.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 290 |
| chips | 2 | 50 | 3.3 | 27.0 | 17.0 | 1.8 | 1.8 | 13.5 | 274 |
| Total | | | 12.6 | 200.2 | 52.4 | 22.0 | 3.9 | 26.2 | 1323 |
| % de l'énergie | | | 4% | 61% | 36% | | | | |

| Aliments | Nombre d'unité | Quantité (g) | Protéines (g) | Glucides (g) | Lipides (g) | dont Saturés (g) | dont Poly-insaturés (g) | dont Mono-insaturés (g) | Energie (kcal) |
|-----------------------|----------------|--------------|---------------|--------------|-------------|------------------|-------------------------|-------------------------|----------------|
| pain au chocolat | 2 | 90 | 6.3 | 41.7 | 21.0 | 13.2 | 1.4 | 6.4 | 381 |
| mars | 3 | 126 | 4.5 | 88.5 | 21.7 | 10.5 | 1.3 | 9.5 | 567 |
| coca-cola | 2 | 660 | 0.0 | 72.6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 290 |
| chips | 2 | 50 | 3.3 | 27.0 | 17.0 | 1.8 | 1.8 | 13.5 | 274 |
| Total | | | 14.1 | 229.7 | 59.6 | 25.4 | 4.4 | 29.3 | 1512 |
| % de l'énergie | | | 4% | 61% | 36% | | | | |

En fonction des besoins énergétiques du sujet, une des 4 surnutritions lui est attribuée afin d'augmenter ses apports de 50%. Par exemple, pour un homme ayant une dépense énergétique de 2700kcal/j, la surnutrition de +1323kcal/j lui est attribuée. La surnutrition commence dès J0 et se termine à J30. Elle est aussi consommée lors des journées d'exploration J15 et J21 (à la suite des explorations métaboliques). Au total, les sujets sont donc surnourris durant 31 jours.

3. Population

3.1 Procédures de recrutement

Il existe différentes méthodes afin de recruter des sujets volontaires sains. Il est possible de recruter par le biais d'annonces sur des sites internet, dans les journaux locaux ou à la radio et par voie d'affichettes apposées en différents lieux (centre commerciaux, facultés, hôpitaux, etc.). De plus, avec les universités, il est généralement possible de diffuser l'annonce à tous les étudiants.

Au CRNH-RA nous disposons aussi d'une base de données de volontaires que nous pouvons interroger afin de trouver le profil recherché. Cette base de données nécessite cependant d'être remise à jour régulièrement et d'être alimentée en permanence par de nouveaux profils.

Avant de participer à un essai clinique tous les sujets doivent au préalable participer à une visite de sélection.

3.2 Visite de sélection

Lors de cette visite, le médecin informe le sujet et répond à toutes ses questions (les objectifs de l'étude, les contraintes et les risques prévisibles de la recherche). Il précise également les droits du sujet dans le cadre d'une recherche biomédicale et recueille son consentement libre, éclairé et écrit. Le formulaire de consentement et la notice d'information comprennent les noms et prénoms du médecin et du sujet, et sont signés et datés par les deux avant la réalisation de tout examen clinique ou para-clinique nécessité par la recherche.

La visite de sélection aussi appelée visite d'inclusion se déroule pour chaque sujet en deux temps : un temps médical (avec un médecin) et un temps diététique (avec une diététicienne). Le temps médical comporte un interrogatoire sur les antécédents personnels et familiaux, les traitements en cours, un examen médical standard (mesure du poids, de la taille et prise de la tension artérielle) ainsi que des prélèvements sanguins nécessaires pour vérifier les critères d'inclusion. Le temps diététique comprend une enquête alimentaire permettant d'évaluer les habitudes de consommation du sujet. Cet entretien permet aussi de déceler d'éventuels troubles du comportement alimentaire qui sont généralement alors jugés comme un critère d'exclusion.

D'une manière générale, pour ces trois études de surnutrition, le recrutement a porté sur des sujets sains ne présentant aucune pathologie (table 5). Les sujets sont non-fumeurs et non claustrophobes (indispensable pour les mesures de calorimétrie indirecte et pour l'examen IRM). De plus, les sujets ont un poids stable au cours des trois derniers mois et pratiquent une activité physique faible ou modérée. Ils ne présentent aucune allergie, ni intolérance alimentaire et déclarent apprécier tous les aliments de la surnutrition. Ils ne présentent pas de dyslipidémie ni de contre indications à l'IRM (présence d'un corps étranger métallique dans l'organisme). Pour finir, ils ne sont pas allergiques aux anesthésiques et n'ont pas de problème de coagulation (nécessaire pour les biopsies).

Table 5 : Critères de sélection des études de surnutritions

| Critères de sélection | Etude n°1 (Surnutrition Lipides) | Etude n°2 (Surnutrition Fructose) | Etude n°3 (Surnutrition Glucides/Lipides) |
|---------------------------|---|--|---|
| Âge (années) | 18 à 55 | 18 à 30 | 18 à 55 |
| IMC (kg.m ⁻²) | 18.5 à 30 | 19 à 25 | 23 à 27 |
| Activité physique | Modérée Questionnaire MOSPA | Faible (<1h de sport/semaine) | Faible Questionnaire d'auto-évaluation |
| Antécédent familial | Aucun antécédent familial de diabète de type 1 ou 2 | Antécédent familial de diabète de type 2 | Aucun antécédent familial de diabète de type 1 ou 2 |

4. Méthodes et calculs

4.1 Le repas test

Le repas test est un outil permettant d'étudier en cinétique les effets d'un apport calorique. Il est ainsi possible d'étudier les excursions glycémiques et lipidiques en lien avec les modifications hormonales. De même, à l'aide de la calorimétrie indirecte, il est possible d'étudier la dépense énergétique et l'oxydation des nutriments. L'ajout au repas test d'un traceur glucidique ou lipidique marqué permet aussi d'étudier le devenir du traceur.

Pour réaliser ce type de test, les sujets sont conviés au centre à 7h après un jeûne de 10h minimum. Ce test nécessite la mise en place d'un cathéter veineux afin de réaliser plusieurs prélèvements sanguins sur une période donnée et aussi d'éviter de devoir repiquer le sujet. La figure 31 ci-dessous illustre le design du repas test utilisé pour l'étude de surnutrition hyperlipidique (étude n°1).

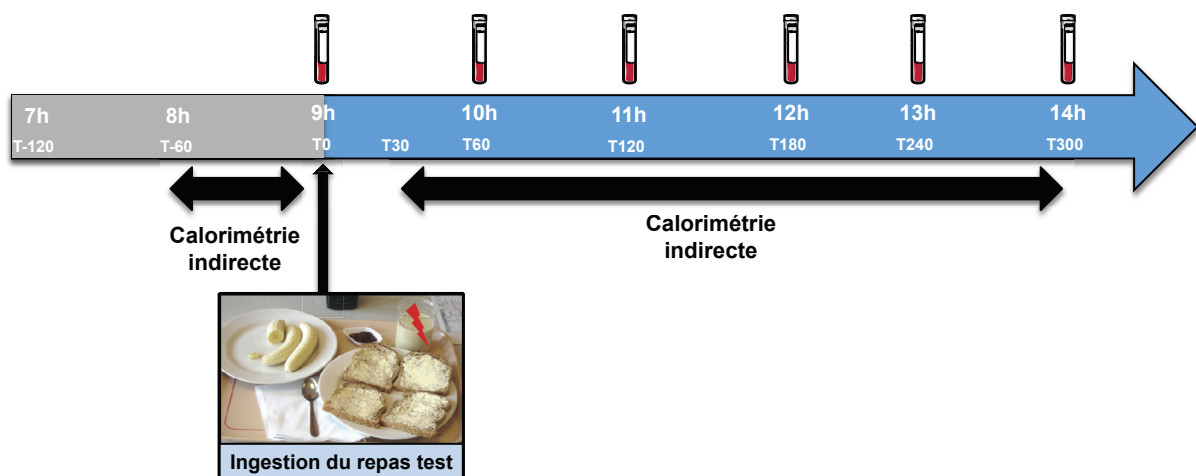


Figure 31 : Design du repas test de la surnutrition hyperlipidique (étude n°1)

Après une période basale, le sujet ingère entièrement le repas test en moins de 30 minutes. Ce repas représente généralement un petit déjeuner « classique » en terme d'énergie et de composition macronutritionnelle. La table ci-dessous présente la composition macronutritionnelle du repas test de la surnutrition hyperlipidique et celui de la surnutrition hyperglucidique hyperlipidique.

Table 6 : Composition macronutritionnelle du repas test (A) de la surnutrition en lipides et (B) de la surnutrition hyperglucidique hyperlipidique

A : Etude n°1

| Aliments | Quantité (g ou mL) | Protéines (g) | Glucides (g) | Lipides (g) | Energie (kcal) |
|---------------------------|-----------------------|------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Fortimel | 200 | 20.0 | 29.4 | 7.0 | 261 |
| Banane | 200 | 2.2 | 42.0 | 0.6 | 182 |
| Pain Jacquet au son | 90 | 9.0 | 33.3 | 1.5 | 183 |
| Confipote | 20 | 0.1 | 8.4 | 0.0 | 34 |
| Margarine allégée | 23 | 0.1 | 0.2 | 13.8 | 125 |
| Beurre | 8 | 0.1 | 0.1 | 6.6 | 60 |
| Huile d'olive | 1 | 0.0 | 0.0 | 1.0 | 9 |
| d ₃₁ palmitate | 1.4 | 0.0 | 0.0 | 1.4 | 13 |
| Total | | 31.5 | 113.4 | 31.9 | 867 |
| % de l'énergie | | 15% | 52% | 33% | |

B : Etude n°3

| Aliments | Quantité (g ou mL) | Protéines (g) | Glucides (g) | Lipides (g) | Energie (kcal) |
|---|-----------------------|------------------|-----------------|----------------|-------------------|
| Lait 1/2 écrémé | 300 | 9.9 | 14.5 | 4.6 | 139 |
| Poudre de lait régilait | 20 | 5.8 | 8.8 | 2.9 | 85 |
| Cacao benco | 20 | 0.7 | 16.6 | 0.5 | 74 |
| Huile de colza | 10 | 0 | 0 | 10 | 90 |
| Pain blanc | 60 | 5.6 | 34 | 0.9 | 167 |
| Beurre | 20 | 0.1 | 0.1 | 16.4 | 148 |
| [1,1,1- ¹³ C ₃]-tripalmitine | 0.25 | 0 | 0 | 0.25 | 2 |
| [1,1,1- ¹³ C ₃]-trioléine | 0.25 | 0 | 0 | 0.25 | 2 |
| Total | | 22.1 | 74.0 | 35.8 | 707 |
| % de l'énergie | | 13% | 42% | 46% | |

Les différences majeures entre ces deux repas tests résident au niveau de l'apport calorique total (867 vs. 707 kcal) due à la quantité de glucides apportés (113.4 vs. 74.0g) et dans le choix des traceurs lipidiques utilisés (d₃₁ palmitate vs. [1,1,1-¹³C₃]-trioléine et [1,1,1-¹³C₃]-tripalmitine). Grâce à l'expérience acquise avec l'étude n°1, nous avons choisi de modifier le repas test utilisé pour l'étude n°3.

Premièrement, nous avons choisi de diminuer la quantité de glucides apportée par le repas test car celui-ci est réalisé afin de suivre le devenir des lipides exogènes ingérés. Une quantité trop importante de glucides entraîne une forte sécrétion d'insuline pouvant masquer l'utilisation des lipides comme substrat énergétique.

Deuxièmement, nous avons choisi de changer de traceurs lipidiques et d'utiliser de la trioléine et de la tripalmitine marquées aux carbones 13 au lieu du palmitate deutéré pour différentes raisons.

Tout d'abord, il est important de souligner que 95% des lipides alimentaires sont apportés sous forme de triglycérides, or, le palmitate deutéré est un acide gras. Celui-ci ne subit donc pas l'action des lipases salivaires ou gastriques afin d'être absorbé. C'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser des traceurs lipidiques sous forme de triglycérides afin de refléter au mieux les lipides alimentaires.

De plus, la palmitate deutéré, par rapport aux traceurs lipidiques marqués aux carbones 13, ne nous permet pas de suivre finement l'oxydation des lipides exogènes. Avec la palmitate deutéré, il est possible d'évaluer la quantité totale de lipides exogènes oxydés sur une période donnée grâce à la quantification en $^2\text{H}_2\text{O}$ dans les urines (Votruba *et al.* 2001). Néanmoins, cette évaluation globale n'est possible que sur une longue période. Avec les traceurs marqués aux carbones 13, il est possible d'évaluer l'oxydation lipidique exogène en quantifiant le $^{13}\text{CO}_2$ dans l'air expiré des sujets (à l'aide de breath tests). Ces échantillons d'airs réalisés à différents temps nous permettent ainsi de suivre en cinétique l'oxydation lipidique exogène. Les traceurs marqués aux carbones 13 ont la particularité d'avoir un marquage C13 au niveau du premier atome de carbone des trois acides gras. Ainsi, l'oxydation totale du traceur génère du $^{13}\text{CO}_2$ détectable dans l'air en spectrométrie de masse. Néanmoins, l'utilisation de traceurs marqués aux carbones 13 implique que les sujets évitent de consommer des aliments naturellement riches en C13 pendant au moins une semaine avant le repas test. Par exemple, le maïs ou le sucre de canne sont des aliments étant naturellement enrichis en carbone 13.

Pour finir, nous avons fait le choix dans l'étude n°3 d'utiliser deux traceurs, la trioléine et la tripalmitine, car ils sont tous deux de bons représentants des acides gras mono-insaturés et saturés.

4.2 Le clamp euglycémique hyperinsulinémique

Le clamp euglycémique hyperinsulinémique est une technique qui a été développée par DeFronzo et est considérée comme la méthode de référence pour l'étude *in vivo* du métabolisme du glucose (DeFronzo *et al.* 1979). Ce test permet de mesurer l'utilisation du

glucose pour un niveau d'insulinémie donné (reflet de la sensibilité à l'insuline). Il consiste en la perfusion d'un débit constant d'insuline, associée à la perfusion d'un débit variable de glucose (permettant le maintien d'une euglycémie (5.0 ± 0.5 mmol/L)). Plus un individu est sensible à l'insuline, plus la perfusion de glucose est importante ; à l'inverse, plus un individu est résistant à l'insuline plus la perfusion de glucose est faible.

En fonction du débit d'insuline choisi, ce test va nous renseigner sur la sensibilité hépatique à l'insuline (faible dose) et/ou sur la sensibilité musculaire à l'insuline (forte dose). L'utilisation d'une faible dose d'insuline nécessite en revanche la perfusion en parallèle d'un traceur (le glucose deutéré).

Pour l'étude de surnutrition hyperlipidique, un clamp à 1 palier d'insuline (forte dose) a été réalisé permettant de mesurer la sensibilité musculaire à l'insuline tandis que dans les deux autres études un clamp à deux paliers d'insuline (faible et forte dose) associé à la perfusion de $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$ glucose (glucose deutéré) a été réalisé permettant de mesurer la sensibilité hépatique et musculaire à l'insuline.

Nous allons maintenant expliquer le clamp euglycémique hyperinsulinémique à deux paliers d'insuline, sachant que la méthode est la même pour le clamp à un palier.

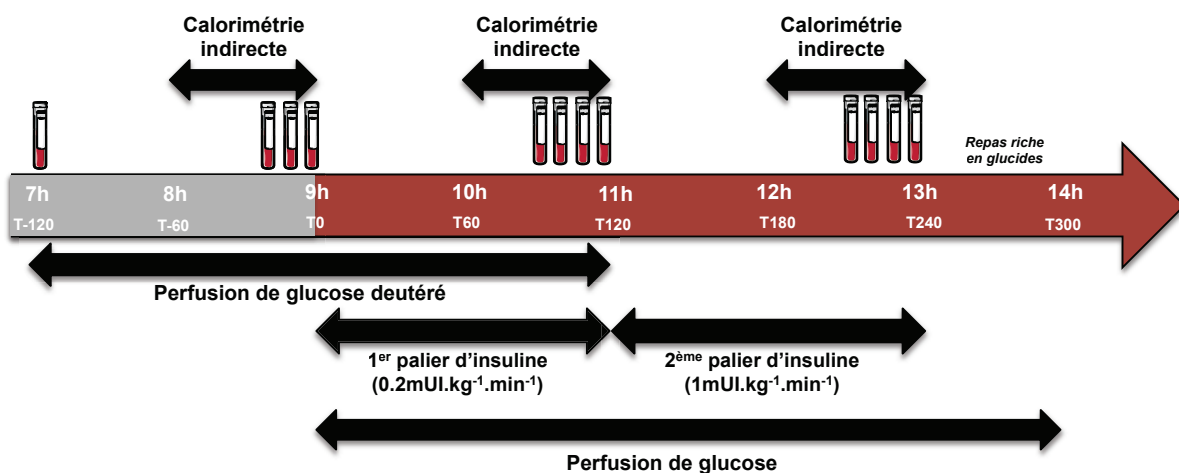


Figure 32 : Design du clamp euglycémique hyperinsulinémique à deux paliers d'insuline

Pour réaliser ce type de test, les sujets sont conviés au centre à 7h, après un jeûne de 10h minimum. Ce test nécessite la mise en place de deux cathéters veineux (un dans chaque bras). Le premier permet la perfusion du glucose (Glucose 20% Aguettant, Lyon, France), du glucose deutéré (Eurisotop, Saint Aubin, France) et de l'insuline (Actrapid® NovoNordisk,

Copenhague, Danemark) à l'aide de pousse seringue (Ivac P7000, Alaris CarfeFusion). Le second cathéter permet de réaliser les prélèvements sanguins. La figure 32 illustre le design du clamp euglycémique hyperinsulinémique à deux doses d'insuline.

Durant la période basale, la perfusion de glucose deutéré permet de calculer la production hépatique de glucose. Durant le premier palier d'insuline, la production hépatique de glucose est freinée et l'utilisation de glucose par les tissus insulino-sensibles est stimulée. Ainsi, l'utilisation de glucose correspond à la somme de la quantité de glucose perfusée et à la production hépatique de glucose. C'est pourquoi, il est nécessaire d'utiliser du glucose deutéré pour pouvoir discriminer le glucose endogène produit et le glucose exogène perfusé. Durant le deuxième palier d'insuline, les forts niveaux d'insuline inhibent totalement la production hépatique de glucose. L'utilisation de glucose correspond donc à la quantité de glucose perfusé. Ainsi, la sensibilité hépatique à l'insuline est évaluée durant l'état stationnaire du premier palier d'insuline (T90, T100, T110 et T120 min) à partir de la moyenne des quatre débits de perfusion en glucose (Mvalue exprimée en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). La sensibilité musculaire à l'insuline est évaluée durant l'état stationnaire du deuxième palier d'insuline (T210, T220, T230 et T240 min) à partir de la moyenne des quatre débits de perfusion en glucose (Mvalue exprimée en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Plus un individu est sensible à l'insuline, plus la perfusion de glucose est importante ; à l'inverse, plus un individu est résistant à l'insuline plus la perfusion de glucose est faible

A la fin des 240 minutes de clamp, la perfusion d'insuline est arrêtée, un repas riche en glucides est servi aux sujets et la perfusion de glucose est maintenue encore pendant une heure afin de palier aux effets rémanents de l'insuline.

4.1 La calorimétrie indirecte

La calorimétrie indirecte a pour but de mesurer la dépense énergétique des sujets ainsi que l'oxydation des différents substrats (protéine, lipide et glucide). Cette technique repose sur l'analyse des échanges gazeux respiratoires à savoir la consommation d' O_2 et la production de CO_2 de l'organisme. L'oxydation complète des substrats (protéine, lipide et glucide) fournit à l'organisme de l'énergie tout en consommant de l' O_2 et en produisant du CO_2 et de l'eau. La mesure des échanges gazeux par calorimétrie indirecte permet ainsi de déterminer la dépense énergétique et l'oxydation des substrats.



Figure 33 : Photo d'un sujet sous un canopy

Pour mesurer la production de CO_2 et la consommation d' O_2 , les sujets sont placés sous un canopy (cloche en plastique transparent ventilée) relié à un analyseur de gaz Deltatrac Metabolic Monitor (Datex instrument, Helsinki, Finlande) ou d'un Quark RMR (Cosmed, Rome, Italie). Une étude réalisée au CRNH-RA a d'ailleurs mis en évidence que les résultats obtenus à partir de ces deux calorimètres sont identiques (Blond *et al.* 2011). Une ventilation de 30 à 40 L/min, est insufflée à travers le canopy en continu (figure 33), évitant que le sujet ne réinspire l'air expiré. La mesure nécessite que le sujet soit éveillé, en position allongée, sans parler et ni bouger. Le canopy dispose d'une jupette solidaire que nous glissons sous l'oreiller du sujet et le long des bras afin de limiter au maximum les fuites de gaz. La chambre dans laquelle se déroule l'examen est climatisée évitant ainsi toute dépense énergétique liée à la thermorégulation. L'air extrait à un débit fixé est ensuite analysé par des capteurs à O_2 paramagnétique et à CO_2 infrarouge. La différence entre l' O_2 inspiré et expiré, et la différence entre le CO_2 inspiré et expiré permet de calculer la consommation d' O_2 (VO_2) et la production de CO_2 (VCO_2) (Haugen *et al.* 2007). Le calorimètre est étalonné avant chaque test à l'aide de gaz de composition connue. Les mesures de calorimétrie (consommation d' O_2 et production de CO_2) ont été réalisées en mode continu (minute par minute) sur des périodes de 60 minutes durant les journées d'exploration.

A partir de la mesure de VO_2 (L/min) et de VCO_2 (L/min), nous pouvons ainsi calculer le quotient respiratoire ($\text{QR}=\text{VCO}_2/\text{VO}_2$) qui nous indique le type de substrat que l'organisme est en train d'oxyder ($\text{QR}=0.7$ pour les lipides; $\text{QR}=1$ pour les glucides et $\text{QR}=0.8$ pour les protéines). A partir des équations de Ferrannini (Ferrannini 1988), nous calculons ainsi précisément l'oxydation glucidique, lipidique et protéique de nos sujets, que ce soit pendant

la période basale, pendant le clamp euglycémique hyperinsulinémique et pendant le repas test. Durant la période basale, nous avons déterminé le métabolisme de base c'est-à-dire la dépense énergétique de repos (kcal/24h) à laquelle s'ajoute la dépense énergétique liée à l'alimentation (thermogénèse post-prandiale) durant la période post-prandiale.

L'azote urinaire a été déterminé (cf. dosages biochimiques) afin de calculer l'oxydation protéique. Ainsi, des recueils urinaires ont été prélevés à jeun et au cours des journées de test. Par la suite, le quotient respiratoire non protéique a été calculé. Il correspond au quotient respiratoire auquel ont été retirées les quantités d'O₂ consommées et de CO₂ produites pour l'oxydation des protéines. Le QRNP nous permet donc de nous affranchir de l'oxydation protéique et ainsi de déterminer le pourcentage d'énergie tiré exclusivement des glucides et des lipides.

Equations utilisées pour les différents calculs :

Equations de Ferrannini (Ferrannini 1988):

- Oxydation des glucides (g/min) : $G = 4.55 \times VCO_2 - 3.21 \times VO_2 - 2.87 \times N$
- Oxydation des lipides (g/min) : $L = 1.67 \times VCO_2 - 1.67 \times VO_2 - 1.92 \times N$
- Oxydation des protéines (g/min) : $P = 6.25 \times N$
- Quotient respiratoire non protéique : $QRNP = (VCO_2 - 0.774 \times P) / (VO_2 - 0.966 \times P)$
- Dépense énergétique (kcal/24h) : $DE = (3.913 \times VO_2 + 1.093 \times VCO_2 - 3.341 \times N) \times 1440$

Equation de DeFronzo (Simonson and DeFronzo 1990) si QRNP>1 :

Lorsque le QRNP est supérieur à 1, les équations ci-dessus ont été utilisées sauf pour l'oxydation des glucides.

- Oxydation des glucides (g/min) : $G = 1.34 \times (VCO_2 - (4.88 N))$

Oxydation des nutriments (G, L et P) en g/min,

Dépense énergétique (DE) en kcal/24h,

VO₂ et VCO₂ en L/min

N (azote urinaire excrété) en g/min

4.2 Les enquêtes alimentaires et les consignes diététiques

L'utilisation de carnets alimentaires est essentielle dans les études où les sujets consomment la surnutrition en plus de leur alimentation habituelle comme dans l'étude n°1 et n°3. En effet, vu que les sujets réalisent le protocole en ambulatoire, le risque est que la surnutrition vienne remplacer la consommation de certains aliments habituellement consommés. C'est pourquoi, il est indispensable de s'assurer que la surnutrition ne modifie pas l'alimentation habituelle. Pour cela, nous demandons aux sujets de remplir de manière la plus exhaustive possible, un carnet alimentaire de plusieurs jours, pendant la période basale et pendant la période de surnutrition. Ainsi, nous pouvons évaluer de manière quantitative et qualitative leur alimentation durant ces deux périodes.

Le carnet alimentaire fait figurer les trois possibles repas de la journée (petit déjeuner, déjeuner et dîner) ainsi que les potentielles collations de la matinée et de l'après-midi. Nous fournissons aussi aux sujets un support photographique alimentaire issu de l'étude SU.VI.MAX (Supplémentation en Vitamines et Minéraux antioXidants) afin qu'ils évaluent correctement les quantités. Quelques pages de ce support sont illustrées dans la figure 34.

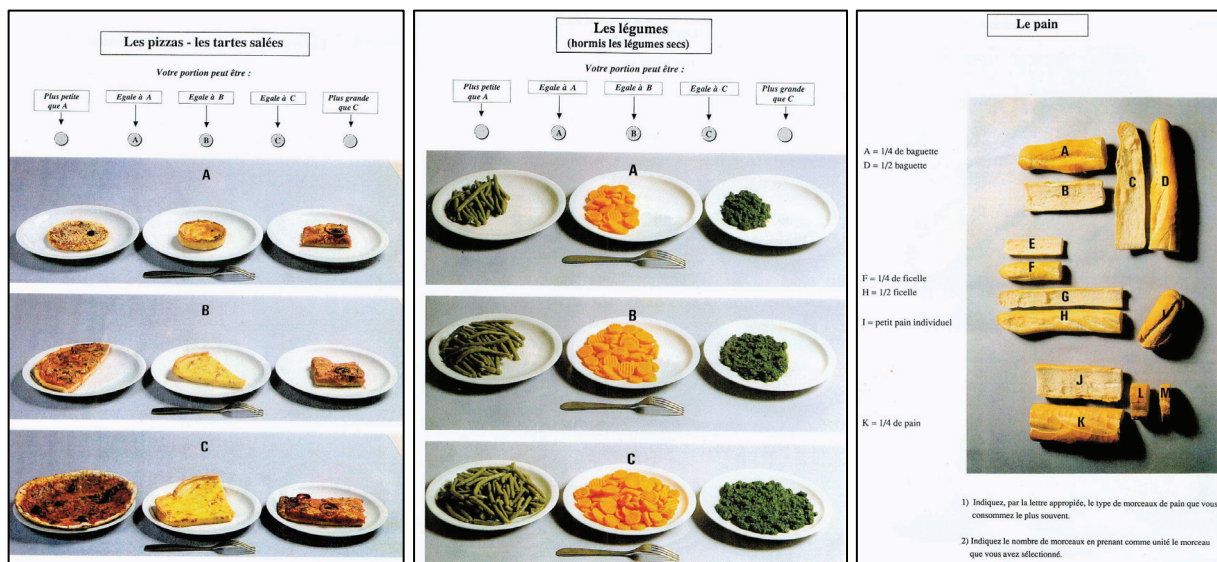


Figure 34 : Exemple de photos du support

Chaque lettre de chaque type d'aliment est référencée dans une table permettant de connaître précisément le poids de chaque portion. En reportant ainsi tous les aliments consommés durant plusieurs jours dans le carnet alimentaire nous pouvons estimer

l'alimentation de chaque sujet. De plus, le carnet alimentaire, une fois complété, est entièrement relu avec la diététicienne qui demande aux sujets de préciser certains aspects. La relecture de ces carnets avec une spécialiste de la diététique est primordiale pour affiner l'évaluation des apports caloriques.

Pour l'étude n°1, trois carnets alimentaires de 5 jours ont été remplis par les sujets durant les jours précédents les trois journées d'exploration métabolique (J0, J14 et J56).

Pour l'étude n°3, deux carnets alimentaires de 7 jours sont complétés (de J-7 à J0 et de J21 à J28).

L'analyse de ces carnets alimentaires permet d'estimer la ration calorique moyenne ingérée de chaque sujet avant et pendant la surnutrition. Cette analyse est réalisée à l'aide du logiciel GENI software©. Nous pouvons ainsi juger de la compliance des sujets.

De plus, grâce à la relecture du premier carnet, le comportement alimentaire de chaque sujet peut être évalué, permettant des conseils individualisés quant à l'ajout de la surnutrition en plus de l'alimentation habituelle. Bien entendu, nous expliquons aux sujets que pendant ce type d'étude ils consomment des aliments sans forcément avoir faim.

4.3 La DEXA

La DEXA (Dual-emission X-ray absorptiometry) est une technique permettant de mesurer la composition corporelle. Cette méthode est considérée comme la méthode de référence pour mesurer précisément la masse grasse, la masse maigre et également la densité osseuse basée sur l'atténuation de rayons en fonction de la densité des tissus.

Pour cet examen, le sujet est allongé, en sous-vêtements, sur une table d'examen pendant 10 minutes afin de prendre une radiographie de son corps grâce à un bras automatique qui se déplace au dessus de lui. Cet examen est indolore et peu irradiant. La dose délivrée à la peau par cet examen est de $0.37\mu\text{Sv}$, soit une dose de $0.74\mu\text{Sv}$ pour un sujet participant à l'étude. D'après les recommandations 2007 de la Commission internationale de protection radiologique, la limite annuelle pour la population générale est de 1mSv , la dose délivrée est donc 1000 fois inférieure aux limites. A titre d'exemple, une radiographie pulmonaire délivre une dose de $50\mu\text{Sv}$ et un scanner du corps entier délivre une dose de $1000\mu\text{Sv}$.

Les études n°1 et n°3 utilisent cette technique afin de mesurer la composition corporelle des sujets. Pour l'étude n°1, cet examen a été réalisé dans le service de Radiologie de l'Hôpital Edouard Herriot à Lyon et de l'hôpital Gabriel Monpied à Clermont Ferrand (DXA, Hologic, Inc., Bedford, MA, USA). Pour l'étude n°3, cet examen est réalisé dans le service de Rhumatologie de l'Hôpital Lyon Sud (Lunar Prodigy, GE Medical Systems). Pour l'étude n°2, la composition corporelle a été estimée grâce à la mesure des plis cutanés.

4.4 L'IRM

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet d'évaluer la répartition du tissu adipeux abdominal et ainsi de calculer un volume de tissu adipeux sous-cutané et un volume de tissu adipeux viscéral. De plus, cette technique permet aussi de quantifier le pourcentage de lipides dans la foie ou dans le muscle squelettique.

Comme illustré dans la figure 35, il est possible, à partir d'un cliché, d'isoler le signal provenant du tissu adipeux et de segmenter le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral. La surface de chaque dépôt est ensuite calculée puis, en fonction de l'épaisseur de la coupe et du nombre de coupes, il est possible de calculer le volume. L'acquisition est toujours réalisée au même niveau anatomique, en prenant comme point de repère les lombaires, de façon à obtenir des clichés permettant pour un même sujet d'évaluer l'évolution des volumes de tissus adipeux.

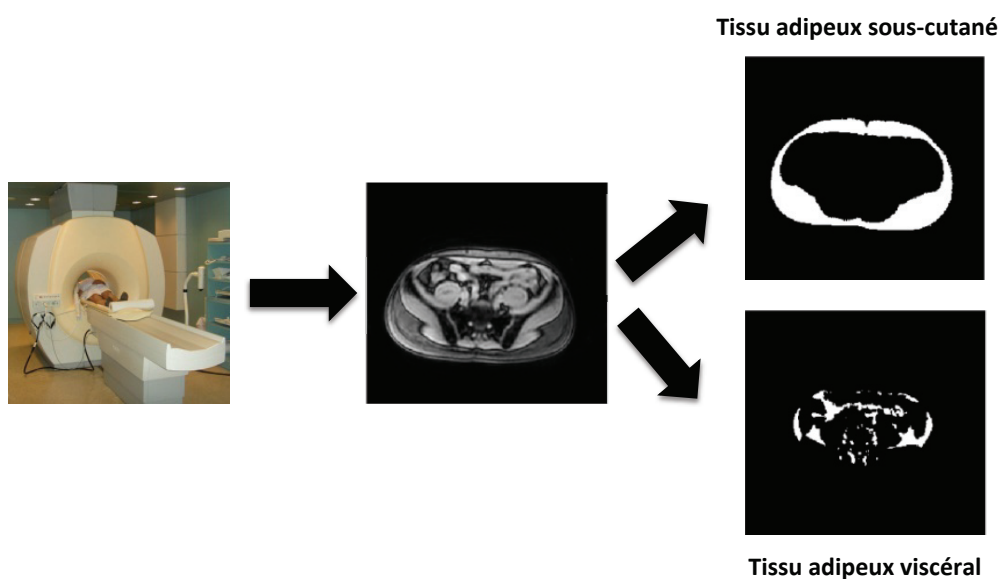


Figure 35 : Illustration de la quantification du volume de tissu adipeux viscéral et sous-cutané

Pour l'étude n°1, les volumes de tissus adipeux ont été mesurés grâce à un cliché obtenu entre les lombaires L2 et L3. De plus, une quantification du pourcentage de lipides au niveau du foie et au niveau du muscle squelettique a été réalisée à partir d'autres clichés. Cet examen a été réalisé sur un IRM de champ 1.5 Tesla (Magnetom Symphonie, Siemens AG, Munich, Germany) dans les services de radiologie respectifs des deux centres. Nous avons ainsi pu suivre l'évolution de la répartition du tissu adipeux au niveau abdominal et l'évolution de l'accumulation de lipides dans le foie et dans le muscle squelettique des sujets au cours de l'étude.

Pour l'étude n°3, nous avons décidé d'aller plus loin dans l'évaluation et la caractérisation des effets de la surnutrition sur le tissu adipeux. Nous avons souhaité exploiter au maximum les possibilités offertes par la réalisation d'un tel examen en couplant l'imagerie et la spectrométrie par résonance magnétique. La spectrométrie par résonance magnétique permet la caractérisation biochimique des lipides que contient le tissu adipeux. Ces différentes méthodes et analyses sont développées en collaboration avec l'équipe du Dr. Olivier Beuf du Centre de Recherche en Acquisition et Traitement de l'Image pour la Santé (Creatis). Grâce à l'expérience de la précédente étude, nous avons décidé de mesurer, dans l'étude n°3, le volume de tissu adipeux sous-cutané et viscéral au niveau de l'abdomen dans son ensemble à partir d'une vingtaine de clichés obtenus entre les lombaires L2 et L4. La réalisation d'autant de clichés nous permet d'évaluer l'évolution 3D du tissu adipeux. La séquence mDIXON 3D multipop est utilisée pour cette évaluation. Un logiciel a d'ailleurs été développé par l'équipe du Dr. Olivier Beuf afin de segmenter automatiquement le tissu adipeux viscéral et le tissu adipeux sous-cutané. La segmentation automatique a été comparée à une segmentation manuelle sur 59 clichés obtenus à partir de 4 examens. Une quantification du pourcentage de lipides au niveau hépatique est aussi réalisée. De plus, nous avons ajouté de nouvelles séquences de spectrométrie afin d'évaluer le degré de saturation et d'insaturation des lipides composant le tissu adipeux sous-cutané et viscéral. La séquence Monovoxel STEAM est utilisée afin de connaître l'index de saturation et d'insaturation des lipides composant chaque dépôt de tissu adipeux. Cet examen est réalisé sur un IRM de champ 3 Tesla (Ingenia 3.0T, Philips) dans le service de radiologie du Pr. Pierre Jean Valette au Centre Hospitalier Lyon Sud. Nous présenterons, par la suite, un peu plus le type de résultats que nous pouvons obtenir grâce à cet examen.

4.5 Les paramètres anthropométriques

Les sujets sont pesés, à jeun et en sous-vêtements, sur une balance numérique calibrée (SECA®) et leur taille est mesurée à l'aide d'une toise. Les tours de taille et de hanches sont mesurés à l'aide d'un ruban à mesure.

4.6 L'activité physique

Pour les études de surnutrition, il est préférable de sélectionner des sujets ayant une activité physique faible ou modérée. Afin de s'assurer d'un faible niveau d'activité physique des sujets, il existe différentes méthodes. Il est possible de simplement demander le temps de sport pratiqué par semaine au sujet et considérer qu'il est inactif s'il pratique moins d'une heure de sport. Néanmoins, il faut aussi considérer les habitudes de vie et le métier du sujet afin d'avoir une réelle idée de son activité physique. L'utilisation de questionnaires d'activité physique comme le MOSPA (The MONICA Optional Study of Physical Activity) ou encore le questionnaire d'autoévaluation (de Ricci et Gagnon) est donc préférable. Ces questionnaires prennent en compte à la fois la pratique d'un sport, mais aussi les habitudes de vie (comme le jardinage, la marche, le niveau d'activité physique du travail). Ces questionnaires permettent ainsi de s'assurer que les sujets sont sédentaires.

D'une manière générale, durant une étude de surnutrition, il est important que les sujets ne modifient pas leur activité physique afin d'éviter toute modification de la dépense énergétique. Même si nous demandons toujours aux sujets de ne pas modifier leur activité physique, il est nécessaire pour les études de surnutrition longue, comme l'étude n°1 et n°3 de s'assurer que les sujets ne modifient pas leur activité physique. Le port d'un accéléromètre ou d'un cardio-fréquencemètre avant et pendant la surnutrition est donc indispensable.

Pour l'étude n°1 les sujets ont porté à trois reprises (avant chaque journée de test) un accéléromètre triaxial (RT3) en continu durant la journée sur une durée de trois jours.

Pour l'étude n°3, les sujets portent à deux reprises un accéléromètre triaxial (Actigraph GT3X+™) et un cardio-fréquencemètre (Actiheart™) en continu durant la journée sur une durée de 7 jours (de J-7 à J0 et de J21 à J28).

4.7 Biopsie de muscle squelettique et analyses réalisées

4.7.1 Réalisation de la biopsie

Dans chaque étude, deux biopsies de muscle squelettique sont obtenues, une avant la surnutrition et une après la surnutrition. Chaque biopsie est obtenue dans une cuisse différente au niveau du muscle vaste latéral (*vastus lateralis*). Il est très important de ne pas réaliser la biopsie sur la même cuisse car la zone biopsée va alors devenir une zone cicatricielle provoquant la modulation de l'expression de gènes de la matrice extracellulaire et de l'inflammation.

Une biopsie est réalisée par le médecin investigateur ou collaborateur à l'aide d'une pince de Weil Blakesley. La zone à biopsier, au niveau du muscle vaste externe, est repérée à la face antéro-externe de la cuisse à la jonction 1/3 inférieur-1/3 moyen du segment joignant l'interligne fémoro-tibial et l'épine iliaque antéro-supérieure. La zone rasée, dégraissée et nettoyée à la Bétadine est anesthésiée à l'aide de 4 à 5 mL de lidocaïne (Chlorhydrate de lidocaïne 2 %, Aguettant, Lyon, France) au niveau de la peau, de la région sous-cutanée et de l'aponévrose. Une incision de la peau et de l'aponévrose est réalisée au scalpel sur 0,5 à 1 cm de longueur. La pince est introduite fermée à une profondeur de 1 à 3 cm dans le muscle puis un mouvement d'ouverture-fermeture sectionne le tissu. La pince est alors retirée puis la zone est comprimée au poing pendant 5 minutes. La fermeture de l'incision est réalisée par des bandes adhésives stériles (strip) maintenues pendant 5 jours. Ce geste est pratiqué en ambulatoire avec reprise de l'activité le jour même. Une légère sensation de contracture est normale pendant 2 à 4 jours. La cicatrice est quasiment invisible.

Le tissu ainsi récolté est traité en fonction des différentes analyses. Pour les analyses transcriptomiques ou protéiques, le tissu est immédiatement congelé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C jusqu'à analyse. A l'inverse, le tissu est directement analysé pour les mesures de respirations sur fibres isolées perméabilisées. Nous allons maintenant détailler chacune des méthodes utilisées qui ont permis de générer les résultats de l'étude n°1 et n°2.

4.7.2 Analyse de l'expression génique

Chaque échantillon de muscle squelettique prélevé, est par la suite broyé à l'aide d'un mortier afin d'obtenir une poudre. Afin de maintenir l'échantillon au froid, le mortier

repose dans de l'azote liquide évitant ainsi toute décongélation du tissu. La poudre ainsi obtenue est ensuite conservée à -80°C jusqu'à analyse.

a) Extraction des ARNm

L'extraction des ARN totaux est réalisée à partir des biopsies de muscle squelettique avec le kit mirVana™ (miRNA Isolation Kit) selon la procédure du fabricant. Par la suite, les ARNs extraits sont purifiés à l'aide de colonne Qiagen (Rneasy mini kit de Qiagen) permettant ainsi d'éliminer les petits ARNs pouvant interférer dans les analyses de puce à ADN.

Une fois l'extraction terminée, nous avons déterminé la quantité d'ARNs par spectrophotométrie (Nanodrop ND1000). Le principe de cette quantification repose sur l'absorbance spécifique des acides nucléiques à 260 nm permettant de déterminer la quantité d'ARNs dans notre échantillon, sachant qu'une unité d'absorbance ou de densité optique équivaut à 40 µg/mL d'ARN. De plus, le ratio d'absorbance A260/A280 doit être proche de 2 afin de s'assurer de la non contamination de notre échantillon par de l'ADN. De même, le ratio A260/A230 doit aussi être proche de 2 afin de s'assurer de la non contamination de notre échantillon par des protéines.

b) Puce à ADN

- **Principe et fonctionnement**

Les puces à ADN permettent d'évaluer semi-quantitativement l'expression de plusieurs dizaines de milliers de gènes. Cette analyse est très onéreuse, c'est pourquoi elle peut être réalisée sur un sous-groupe de sujets présentant les mêmes caractéristiques cliniques et la même réponse à la surnutrition que la population globale de l'étude. Cette analyse a été réalisée en collaboration avec un partenaire industriel (Genfit, Lille) pour l'étude n°1 et l'étude n°2. Les puces à ADN Affymetrix Human HG U133 Plus 2.0 ont été utilisées afin d'évaluer les variations d'expression génique de 47 401 transcrits du muscle squelettique en réponse à la surnutrition.

Une puce à ADN Affymetrix est une matrice de verre sur laquelle est fixée (*in situ*), par photolithographie et chimie combinatoire, des dizaines de milliers de sondes (oligonucléotides de 25 bases). Ces sondes, aussi appelées « probes » en anglais,

représentent l'ensemble des transcrits du génome humain. Le fonctionnement des puces à ADN repose sur l'appariement complémentaire des bases de deux séquences de nucléotides, c'est le phénomène d'hybridation. Cette hybridation formant un duplex (double brin) entre la sonde et la cible sera par la suite détectée par photoluminescence.

- **Amplification et marquage**

Il est important de noter que l'étude du transcriptome par la technique de puce à ADN nécessite une quantité importante d'ARN total. C'est pourquoi, afin d'obtenir une quantité suffisante d'ARN, une étape d'amplification est réalisée. L'utilisation du kit GeneChip3' IVT Express kit permet de générer une quantité importante d'ARN anti-sens marqué à la biotine. Brièvement, les ARN extraits à partir de notre échantillon sont tout d'abord transcrits en ADNc par transcriptase inverse. Cet ADNc est par la suite transcrit pour reconstituer le brin d'ARNm originel et en y incluant des nucléotides marqués avec de la biotine. Cette transcription *in vitro* génère donc de l'ARN anti-sens marqué à la biotine.

- **Hybridation et lecture des puces**

Les ARN anti-sens marqués à la biotine générés à partir de notre échantillon (cibles) sont par la suite mis en contact avec les sondes de la puce à ADN afin d'obtenir une hybridation complémentaire cible/sonde. Les puces sont, par la suite, lavées afin d'éliminer les cibles non fixées ou fixées non spécifiquement. Pour finir, les puces sont colorées à l'aide d'une solution streptavidine-phycoérythrine permettant de révéler les sondes hybridées. Les puces à ADN sont ensuite scannées avec le GeneChip Scanner 3000 7G et analysées avec un module de criblage GeneArray à une longueur d'onde de 488 nm. L'émission de lumière à une longueur d'onde de 570 nm est proportionnelle à la quantité de cible liée à chaque position des oligonucléotides sur la puce GeneChip®. Le signal fluorescent est détecté et analysé, en partant du principe que l'intensité du signal est proportionnel au nombre d'ARNc hybridés.

Les images ainsi générées ont été traitées par Dr. Emmanuelle Meugnier, ingénieur de recherche responsable de la plateforme génomique du laboratoire. Afin d'éviter et d'éliminer tous les biais, les données ont été normalisées grâce à l'algorithme RMA (Robust Multichip Analysis) et ont été filtrées grâce à l'algorithme MAS 5.0 permettant d'éliminer les

sondes « absentes » de notre échantillon. Les données normalisées et filtrées ont ensuite été analysées avec le test de Limma (Smyth 2004). Les sondes présentant une p-value <0.001 ont été considérées comme significativement régulées par la surnutrition. Le jeu de données est disponible et référencé dans la base de données Gene Expression Omnibus (GSE50484 pour l'étude n°1 et GSE70218 pour l'étude n°2).

Afin d'évaluer les grandes fonctions biologiques impactées par la surnutrition dans le muscle squelettique, nous avons utilisé deux outils (DAVID : Database for Annotations, Visualization, and Integrated Discovery et GSEA : Gene Set Enrichment Analysis) nous permettant de déterminer l'enrichissement des gènes (Subramanian *et al.* 2005; Huang *et al.* 2009). Ces deux méthodes permettent d'identifier, à partir de la liste de gènes significativement régulés, un enrichissement significatif des fonctions biologiques.

c) RT-qPCR

Les données de puces, et plus spécifiquement les gènes d'intérêts significativement régulés, doivent systématiquement être confirmées par une approche plus quantitative qu'est la RT-qPCR pour « real time quantitative polymerase chain reaction). Cette méthode de référence permet de mesurer de façon fine la quantité initiale d'ARNm présent dans l'échantillon.

Tout d'abord, une transcription inverse (RT) est réalisée afin d'obtenir de l'ADNc à partir des ARNs totaux extraits. Brièvement, après la dénaturation des ARNs totaux (65°C pendant 5 min), la transcription inverse est réalisée avec 1µg d'ARN totaux, en présence de la rétrotranscriptase (Superscript II® RNASE H⁻, Invitrogen), d'oligo dT et d'hexamères d'oligonucléotides non spécifiques (Random Hexamers, Promega). La transcription inverse est ensuite suivie d'un traitement à la RNase H permettant la dégradation de l'ARN des doubles brins ADNc/ARN. Cette étape est nécessaire pour ne pas perturber la PCR par la suite.

Par la suite, la PCR quantitative est réalisée sur 5µL du produit de RT dilué au 1/60ème mélangé à 15 µL de milieu réactionnel ABSolute™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene, Courtaboeuf, France), à l'aide d'un Rotor-Gene 6000™ (Corbett Research, Mortlake, Australia).

4.7.3 Mesure de la respiration mitochondriale

L'étude de la respiration mitochondriale sur fibres isolées perméabilisées a été réalisée par l'équipe de Clermont Ferrand d'après la méthode développée par Saks *et al.* (Saks *et al.* 1998). Brièvement, cette analyse permet d'étudier l'activité de l'ensemble de la population des mitochondries *in situ*. Les faisceaux de fibres sont mécaniquement séparés avec des pinces puis rendus perméables grâce au traitement avec une solution de saponine (60 mg/mL) pendant 20 minutes. Le taux de respiration des fibres est mesuré à 25 °C en utilisant un système de oxygraphie (Hansatech Instruments Ltd, Pentney, Royaume-Uni) (Bonnard *et al.* 2008). L'état 3 est mesuré en présence de glutamate (5 mM), malate (2 mM), succinate (5 mM), après l'ajout d'ADP (1 mM) et l'état 4 est mesuré après l'addition de 60 µM atractyloside. L'atractyloside est un inhibiteur spécifique qui inhibe la protéine de transport de l'ATP à travers la membrane interne. Les fibres sont séchées pendant 24 heures à 100°C puis pesées. Le taux de respiration est exprimé en nano atomes d'O.min⁻¹.mg⁻¹ de fibre sèche. Le couplage respiratoire (CR ou RCR en anglais pour respiratory control ratio) est calculé comme le rapport des taux de respiration entre l'état 3 et l'état 4.

4.7.4 Mesure de l'acétylation de PGC1α

L'acétylation de PGC-1α est mesurée par immunoprécipitation de PGC1α à partir de lysat de biopsie musculaire. Deux milligrammes du total de protéines extraites sont utilisés pour l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-PGC1α (Millipore) suivi par un Western blot utilisant soit PGC1α ou un anticorps anti-acétyl-lysine (Cell Signaling) comme précédemment rapporté (Cantó *et al.* 2009).

4.7.5 Mesure du contenu en NAD⁺/NADH

Le contenu en NAD⁺/NADH est mesuré avant et après surnutrition à partir du lysat de biopsie musculaire détaillé auparavant en suivant les instructions du kit commercial (Bio-assay Systems).

4.7.6 Mesure protéique d'UCP3

La quantité de protéine UCP3 est mesurée avant et après surnutrition à partir du lysat de biopsie musculaire. Les protéines mitochondriales (50 µg) sont séparées sur gel de type SDS-PAGE puis transférées sur une membrane PVDF (Fluorure de polyvinylidène). Les

membranes sont ensuite incubées pendant une nuit à 4 °C avec l'anticorps anti-UCP3 (ab3477; Abcam), puis pendant une heure à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire couplé à la Horseradish peroxydase. La présence de protéine est révélée par chimioluminescence grâce à l'activité de l'enzyme peroxydase et à l'aide du kit Enhanced Chemiluminescence System (Thermo Fisher Scientific). Le signal est quantifié avec le logiciel image J développé par le NIH. Les signaux sont normalisés à l'aide de la coloration au bleu de Coomassie.

4.8 Dosages biochimiques

Les prélèvements sanguins sont réalisés à l'aide d'un cathéter brachial veineux posé à l'arrivée du sujet permettant ainsi de recueillir du sang de manière répétée sans avoir à repiquer les sujets. En fonction du dosage, les prélèvements sanguins sont ainsi recueillis dans différents tubes (EDTA ou héparine). Les tubes sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à 4500 rotations par minute. Par la suite, le plasma ou sérum est récupéré et stocké à -20°C avant d'être analysé.

Les concentrations plasmatiques en glucose, triglycérides et acides gras libres non estérifiés sont déterminées par méthode enzymatique colorimétrique sur un spectrophotomètre Cary 50 Bio (Varian, Mulgrave, Australia). Les différents kits utilisés sont les suivants : glucose (Modular, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), triglycérides (TG PAP 150, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) acides gras libres non estérifiés (NEFA C kit, Wako Parel. Chemicals, Neuss, Germany). Les concentrations en insuline sont déterminées par technique de radio-immuno essai (INS-IRMA Biosource, Nivelles, France).

L'azote urinaire est déterminé par chimioluminescence (Antek 490, ALytech, Juvisy, France) à partir des urines collectées durant les différentes périodes de journée d'exploration pour permettre les calculs d'oxydation.

4.9 Analyses statistiques

Toutes les données du manuscrit sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (erreur standard moyenne). Les différentes méthodes statistiques utilisées pour comparer les données sont présentées au cours des différents articles et ne seront donc pas répétées ici.

Chapitre 4 : Résultats

1. L'impact d'une surnutrition hyperlipidique sur le muscle squelettique (étude n°1)

1.1 Introduction

Une alimentation riche en lipides contribue à une surconsommation passive de calories (Lissner *et al.* 1987). Afin de mimer expérimentalement les effets d'une balance énergétique positive due à une surconsommation de lipides, nous avons soumis des volontaires sains à 56 jours de surnutrition hyperlipidique (+757 kcal/j). Cette surnutrition hyperlipidique consiste à la consommation journalière de 20g de beurre, 40g d'amandes (non salés) et 100g de comté en plus de l'alimentation habituelle des sujets. La surnutrition est composée à 79% de lipides, 20% de protéines et 1% de glucides.

L'adaptation du corps humain face à différents apports caloriques, qu'ils soient en excès ou en déficit, implique la coordination des voies métaboliques des différents organes pour maintenir l'homéostasie énergétique. Il a très bien été démontré que la restriction calorique induit, au niveau moléculaire, l'activation de la voie SIRT1/PGC1 α qui stimule la biogénèse mitochondriale et oriente le métabolisme vers l'oxydation des lipides permettant ainsi l'épargne du glucose (Gerhart-Hines *et al.* 2007; Cantó *et al.* 2010; Houtkooper *et al.* 2010, 2012). L'activation de cette voie est rendue possible par SIRT1 dont l'activité dépend du niveau intracellulaire en NAD⁺. En condition de déficit énergétique, le ratio en NAD⁺/NADH augmente, contribuant à activer SIRT1 qui va alors déacétyler et activer le cofacteur PGC1 α . PGC1 α contrôle l'expression de nombreux gènes en ayant la capacité de se lier à certains facteurs de transcription comme NRF1, ERR α ou encore TFAM (Scarpulla 1997; Wu *et al.* 1999; Scarpulla *et al.* 2012). SIRT1 est maintenant considéré comme un chef d'orchestre permettant de coordonner l'expression génique des cellules en fonction du statut énergétique. Néanmoins, son rôle dans une situation inverse d'excès énergétique n'a été que très peu étudié.

Nous avons donc entrepris d'étudier l'effet d'une surnutrition sur la voie SIRT1/PGC1 α en lien avec l'expression génique du muscle squelettique. Le muscle squelettique jouant un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie énergétique, il est nécessaire de bien comprendre comment un excès calorique modifie son fonctionnement et quels sont les mécanismes impliqués, notamment la contribution de la voie SIRT1/PGC1 α .

1.2 Article 1 : Regulation of Energy Metabolism and Mitochondrial Function in Skeletal Muscle During Overfeeding in Healthy Men

Article 1 : La régulation du métabolisme énergétique et de la fonction mitochondriale du muscle squelettique à la suite d'une surnutrition chez des sujets sains

K. Seyssel, M. Alligier, E. Meugnier, E. Chanseau, E. Loizon, C. Canto, E. Disse, S. Lambert-Porcheron, J. Brozek, E. Blond, J. Rieusset, B. Morio, M. Laville, and H. Vidal

Publié en 2014 dans Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism

Regulation of Energy Metabolism and Mitochondrial Function in Skeletal Muscle During Lipid Overfeeding in Healthy Men

K. Seyssel, M. Alligier, E. Meugnier, E. Chanseume, E. Loizon, C. Canto, E. Disse, S. Lambert-Porcheron, J. Brozek, E. Blond, J. Rieusset, B. Morio, M. Laville,* and H. Vidal*

INSERM Unité Mixte de Recherche 1060 (K.S., M.A., E.M., E.L., E.D., E.B., J.R., M.L., H.V.), Laboratoires CarMeN et Centre Européen pour la Nutrition et la Santé, Université Lyon 1, F-69600 Oullins, France; Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes (K.S., M.A., E.D., S.L.-P., E.B., M.L., H.V.), Centre Hospitalier Lyon-Sud, F-69310 Pierre Bénite, France; Institut National de la Recherche Agronomique Unité 1235 (E.M., J.R., M.L., H.V.), F-69600 Oullins, France; Institut National de la Recherche Agronomique Unité Mixte de Recherche 1019 (E.C., B.M.), Unité de Nutrition Humaine and Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Université d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France; Laboratory of Integrative and Systems Physiology (C.C.), Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, School of Life Sciences - Institute of Bioengineering, CH-1015 Lausanne, Switzerland; and Genfit (J.B.), F-59120 Loos, France

Context/Objective: The aim of this study was to evaluate the regulation of the fuel partitioning and energy metabolism in skeletal muscle during lipid overfeeding in healthy men.

Design/Participants/Intervention: Thirty-nine healthy volunteers were overfed for 56 days with a high-fat diet (3180 kJ/d). Energy metabolism (indirect calorimetry) was characterized in the fasting state and during a test meal before and at the end of the diet. Skeletal muscle biopsies were taken at day 0 and day 56.

Main Outcome Measures: Change in gene expression, mitochondrial respiration, nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) content, and acetylation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) in skeletal muscle was measured.

Results: Overfeeding increased body weight (+2.6 kg) and fat mass concomitantly with a shift in the use of substrates as energy fuel toward preferential oxidation of carbohydrates instead of lipids. Changes in lipid metabolic gene expression supported this observation, with a reduction in pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression that could be the consequences of decreased NAD⁺ concentration and reduced deacetylase activity of the sirtuins, as supported by hyperacetylation of PGC-1 α after overfeeding. Interestingly, this reduction of the sirtuin PGC-1 α pathway was associated with increased mitochondrial gene expression and higher respiration rate under these conditions.

Conclusion: Adaptation to lipid overfeeding and regulation of fuel partitioning in human muscle appear to rely on a dissociation between the regulatory functions of the sirtuin-PGC-1 α pathway on fatty acid oxidation and on mitochondrial regulation. This may facilitate lipid storage during a period of positive energy balance while maintaining mitochondrial functions and oxidative capacities. (*J Clin Endocrinol Metab* 99: E1254–E1262, 2014)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2014 by the Endocrine Society

Received December 12, 2013. Accepted March 14, 2014.

First Published Online March 31, 2014

* H.V. and M.L. contributed equally to this work.

Abbreviations: ACACA, acetyl-CoA carboxylase- α ; DAVID, Database for Annotations, Visualization, and Integrated Discovery; GSEA, gene set enrichment analysis; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; NEFA, nonesterified fatty acid; PDH, pyruvate dehydrogenase complex; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinase 4; PGC-1 α , PPAR- γ coactivator-1 α ; PPAR, peroxisomal proliferator-activated receptor; RT-qPCR, real-time quantitative PCR; SIRT1, sirtuin 1; UCP3, uncoupling protein 3.

Adaptation to different food availability implies the coordination of tissue-specific metabolic pathways to maintain energy homeostasis. During a period of positive energy balance, it has been consistently demonstrated that the excess of energy is stored mainly in the adipose tissue under the form of triacylglycerols (1–4). The early phase of weight gain is therefore characterized by a coordinated induction of biological processes leading to efficient lipid storage and adipose tissue development together with a reduced lipid use as energy fuel (5–8). However, the mechanisms involved in the regulation of energy metabolism and particularly of lipid oxidation in skeletal muscle, the tissue in which most of the energy expenditure takes place, are still poorly defined in humans.

Fuel partitioning and storage of lipid and carbohydrates are finely regulated in skeletal muscle. At the molecular level, the sirtuin 1 (SIRT1)-peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α (PGC-1 α) pathway has emerged as one of the key actors, through regulation of mitochondrial biogenesis and lipid oxidation (9–12). SIRT1, a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent protein deacetylase, is activated and up-regulates PGC-1 α under nutrient deprivation and energy stress conditions, leading to an increase mitochondrial biogenesis (12, 13). Activation of SIRT1 during food

deprivation is due to the intracellular increase in NAD⁺ to NADH ratio, inferring that the SIRT1-PGC-1 α pathway is an energetic sensor of the cell (11–14). This pathway is now described as a major regulator of metabolic processes in various tissues, such as the liver (11), skeletal muscle (12), and white adipose tissue (15).

To get more insight into the molecular events contributing to the adaptive mechanisms in skeletal muscle of subjects gaining weight during positive energy balance, we took the opportunity of a recent lipid overfeeding protocol (+3180 kJ/d during 56 d) conducted in a large cohort of healthy men (8, 16). We analyzed in details skeletal muscle gene expression and mitochondrial function in a subgroup of these subjects and studied the association with the changes in energy expenditure and substrate oxidation.

Materials and Methods

Subjects

Thirty-nine healthy male volunteers participating in a previous overfeeding trial (8) were involved in this part of the study. The characteristics of the subjects are shown in Table 1. All were in good health without a history of diabetes and a stable weight. They gave written informed consent and the protocol was approved by the local ethic committees.

Table 1. Anthropometric and Metabolic Characteristics of the Subjects Before (d 0) and After 14 (d 14) and 56 days (d 56) of Overfeeding

| | D0 | D14 | D56 |
|--|-------------|--------------------------|--------------------------|
| N | 39 | 39 | 39 |
| Age, y | 34 ± 1 | | |
| Anthropometric parameters | | | |
| Body weight, kg | 79.4 ± 1.8 | 80.1 ± 1.8 ^a | 82.0 ± 1.8 ^a |
| Weight gain, kg | | 0.73 ± 0.15 ^a | 2.57 ± 0.24 ^a |
| Body mass index, kg/m ² | 25.3 ± 0.5 | 25.5 ± 0.5 ^a | 26.1 ± 0.5 ^a |
| Waist circumference, cm | 90.2 ± 1.6 | | 93.3 ± 1.6 ^a |
| Fat mass, % | 20.0 ± 0.9 | | 20.7 ± 0.9 ^b |
| Subcutaneous adipose volume, cm ³ | 192 ± 15 | | 204 ± 16 ^b |
| Visceral adipose volume, cm ³ | 197 ± 22 | | 215 ± 23 ^b |
| Intrahepatic lipid content, % | 16 ± 2 | | 18 ± 2 ^a |
| Metabolic parameters | | | |
| Fasting glucose, μ M | 5.14 ± 0.06 | 5.18 ± 0.09 | 5.28 ± 0.07 ^c |
| Fasting insulin, mIU/L | 9.5 ± 0.4 | 11.1 ± 0.5 ^b | 10.1 ± 0.4 |
| HOMA | 2.17 ± 0.08 | 2.57 ± 0.14 ^b | 2.36 ± 0.09 ^c |
| Fasting triacylglycerols, mM | 1035 ± 86 | 1068 ± 88 | 1025 ± 85 |
| Fasting free fatty acids, μ M | 435 ± 25 | 326 ± 26 ^a | 362 ± 18 ^b |
| Total cholesterol, mM | 4.6 ± 0.1 | | 4.6 ± 0.1 |
| Respiratory quotient | 0.82 ± 0.01 | 0.85 ± 0.01 ^a | 0.84 ± 0.01 ^c |
| Lipid oxidation rate, mg/kg ⁻¹ · min ⁻¹ | 0.81 ± 0.03 | 0.69 ± 0.05 ^b | 0.72 ± 0.03 ^b |
| Carbohydrate oxidation rate, mg/kg ⁻¹ · min ⁻¹ | 1.51 ± 0.12 | 1.92 ± 0.15 ^a | 1.71 ± 0.14 ^c |
| Resting metabolic rate, kJ/d | 7104 ± 123 | 7393 ± 159 ^a | 7395 ± 130 ^a |

Abbreviation: HOMA, homeostasis model assessment. Data are means ± SEM.

^a $P < .001$ using the Student's paired t test.

^b $P < .01$ using the Student's paired t test.

^c $P < .05$ using the Student's paired t test.

Overfeeding protocol

The study consisted in 56 days of overfeeding during which the subjects were instructed to add during their meals and to their usual daily diet, 100 g of cheese, 20 g of butter, and 40 g of unsalted almonds, representing 3180 kJ (760 kcal) per day (8). These supplements were provided to the subjects and represented about 70 g of lipids, mainly composed by saturated (46.3%) and monounsaturated (44.7%) fatty acids (8, 17). The subjects were asked to maintain their usual eating behavior and their regular level of physical activity.

Metabolic explorations and biopsies

Fasting blood samples were drawn for analysis of hormones and plasma metabolites. Glycemia was measured using hexokinase method (Roche Diagnostics). Plasma insulin was measured by RIA (immunoradiometric assay kit; IRE-Medgenix). Total cholesterol, triglycerides, and nonesterified fatty acids (NEFAs) were determined by enzymatic methods (NEFA C kit; Wako Parel Chemicals).

Indirect calorimetry measurements were performed during 60 minutes under ventilated hood (Deltatrac Datex) in the fasting state. Lipid and carbohydrate oxidation rates and resting metabolic rate were calculated using Ferrannini's equation (18). After this exploration, subjects were submitted to a percutaneous biopsy of the vastus lateralis muscle (19). The muscle tissue (~80 mg) was taken under local anesthesia (2% lidocaine) at day 0 and day 56 (at the counterlateral thigh), immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C , except for a small sample of approximately 20 mg that was processed for measurement of mitochondrial respiration in permeabilized fibers in a subgroup of 16 subjects. Muscle biopsies were not taken in 12 subjects who were instead submitted to a test meal (16). These subgroups did not differ from the whole population regarding body composition and response to overfeeding and their characteristics (Supplemental Table 1). In all subjects, body composition was determined by dual-energy X-ray absorptiometry (Hologic, Inc) and adipose tissue distribution (sc and visceral fat regions and liver) by magnetic resonance imaging (Magnetom Symphonie 1.5 Tesla; Siemens AG) as previously indicated (8, 16).

For the test meal, the 12 subjects consumed, in less than 30 minutes, a fixed meal of 3634 kJ (52% carbohydrates, 15% proteins, and 33% lipids) including a beverage (200 mL of Fortimel; Nutricia), banana (200 g), bread (90 g), butter (30 g), and jam (20 g). Blood samples were collected before and each hour during 5 hours. Substrate oxidation was measured by indirect calorimetry during the whole test.

Microarrays

RNA profiling in skeletal muscle was performed using Affymetrix Human HG U133 Plus 2.0 arrays, covering 47 401 transcripts (8). One hundred nanograms of total RNA were processed and hybridized with the GeneChip3' IVT Express kit according to the manufacturer's instructions. Chips were scanned with GeneChip Scanner 3000 7G. Muscle RNA samples from 12 subjects were individually analyzed. The characteristics of these subjects are presented in Supplemental Table 1 and did not differ from the whole cohort.

Expression values and absent/present calls were calculated using MAS 5.0 (Affymetrix, 2002) and RMA expression summary algorithms implemented in R (version 2.9.2) within the Affy package (20). Data were filtered on detection calls so that

probe sets considered absent across all subjects and all time points were removed. Statistical analysis was then performed on 30 970 probe sets with Limma package (21). The data set is available from the Gene Expression Omnibus database (GSE50484).

To test for the enrichment of genes or functional pathways, we used version 2.07 of the computational method gene set enrichment analysis (GSEA) (22) and the curated gene sets from the C2 collection of the Molecular Signatures Database, MSigDB (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>). Biological functions and pathways regulated during overfeeding were also identified using the Database for Annotations, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) (23).

Quantification of mRNA by real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

RT-qPCR assays were performed using a Rotor-Gene 6000 (QIAGEN) in samples from 20 subjects. Values were normalized using hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase. The studied genes and the primer sequences are listed in Supplemental Table 2.

Mitochondrial respiration

Mitochondrial respiration was studied in saponin-skinned fibers as described by Saks et al (24). Fiber bundles were mechanically separated with tongs and permeabilized with saponin (60 mg/L, 20 min). Fiber respiration rates were measured at 25°C using an oxygraph system (Hansatech Instruments Ltd) (25). State 3 was measured in the presence of 5 mM glutamate, 2 mM malate, and 5 mM succinate after the addition of 1 mM ADP, and state 4 was measured after the addition of 60 μM atracyloside. Fibers were dried for 24 hours at 100°C and weighed. Respiration rates were expressed as nanoatoms $\text{O}/\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ dried fiber. The respiratory control ratio was calculated by dividing state 3 by state 4 respiration rates.

PGC-1 α acetylation

PGC-1 α acetylation was analyzed by immunoprecipitation of PGC-1 α from muscle lysates. Two milligrams of total protein extracts were used for immunoprecipitations with anti-PGC-1 α antibody (Millipore) followed by Western blot using either PGC-1 α or an acetyl-lysine antibody (Cell Signaling) as previously reported (13).

NAD⁺ measurements

NAD⁺ was measured on acidic extracts from skeletal muscle following the instructions of a commercially available kit (Bioassay Systems).

Western blot of uncoupling protein 3 (UCP3)

Mitochondrial proteins (50 μg) from muscle biopsies were separated by sodium dodecyl sulfate per 10% PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were incubated overnight at 4°C with UCP3 antibody (ab3477; Abcam). The signal was detected using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and revealed with the enhanced chemiluminescence system (Thermo Fisher Scientific). The signal was quantified with National Institutes of Health ImageJ software. Signals were normalized to the Coomassie Blue staining of the gel.

Statistical analyses

All data are presented as mean \pm SEM. Comparisons between time points (d 0 vs d 14 and d 0 vs d 56) were performed using a Student paired *t* test or using a nonparametric Wilcoxon test when data were not normally distributed. The areas under the curve were calculated using the trapezoidal method. A value of $P < .05$ was considered significant.

Results

Table 1 summarizes the changes in the anthropometric and metabolic characteristics of the subjects at baseline, d 14, and d 56. They experienced a moderate rise in body weight (+2.6 kg, $P < .001$), but their fat mass, waist circumference, and abdominal sc and visceral adipose tissue volumes significantly increased. Fasting NEFA concentrations were markedly decreased. Indirect calorimetry indicated that the use of substrate as energy fuel was modified with a preferential oxidation of carbohydrates instead of lipids in the fasting state (Table 1). Significant reduction of the rate of lipid oxidation was evidenced already after 14 days (13%, $P = .006$, Figure 1A). The reduction in the rate of lipid oxidation persisted in the fed state in the subgroup of volunteers submitted to the test meal (Figure 1B). Despite similar reduction in NEFA levels after meal at d 0 and d 56 (Supplemental Figure 1), the total lipid oxidation rate

remained significantly lower at d 56 compared with d 0 during almost all the test (Figure 1B).

Analysis of gene expression in skeletal muscle identified 821 probes (corresponding to 673 unique genes) with significant changes ($P < .001$) in the expression level during overfeeding (Supplemental Table 3). Using DAVID, we found that the most significantly enriched pathways were related to lipid metabolism, the oxidoreduction process, and mitochondria (Figure 2A). This result was confirmed using the supervised GSEA method based on established gene sets, which identified mitochondria, PGC-1, OXPHOS, electron transport, and fatty acid metabolism among the sets with a significant enrichment score (Figure 2B).

Regarding the genes related to lipid metabolism, there was a coordinated up-regulation of a cluster of genes coding enzymes involved in lipid transport [low density lipoprotein receptor (*LDLR*), apolipoprotein O (*APOO*), apolipoprotein A1 binding protein (*APOA1BP*), and fatty acid binding protein 3 (*FABP3*)], lipogenesis [acetyl-CoA carboxylase- α (*ACACA*), acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (*ACSS2*), fatty acid desaturase 1 (*FADS1*), and stearoyl-CoA desaturase (*SCD*)], triglyceride synthesis, and lipid droplet organization [diacylglycerol O-acyltransferase 2 (*DGAT2*), perilipin (*PLIN2*), and patatin-like phospholipase domain containing 4 (*PNPLA4*)], indicating a concerted orientation of lipid metabolism towards storage. To validate the Affymetrix data, changes in the expression of several genes were verified by real-time quantitative PCR (Table 2). Despite low variations during the intervention, it was important to note that we globally found very similar responses with the two methods, thus supporting the reliability of the microarray data.

Among the genes coding well-known regulators of fatty acid oxidation, we found that *ACACA* mRNA level was increased during overfeeding, but neither malonyl-CoA decarboxylase (*MLYCD*) nor carnitine palmitoyl-transferase 1 (*CPT1m*) expression was affected (Table 2). The complementary well-described mechanism involved in the regulation of the balance between carbohydrate and lipid oxidation is the control of the pyruvate dehydrogenase complex (PDH) by the pyruvate dehydrogenase kinase 4 (*PDK4*) (26). Overfeeding was associated with a significant down-regulation of *PDK4* mRNA levels (Table 2).

Gene sets and function analyses of the microarray data also revealed significant enrichment in genes related to mitochondria and the respiratory chain. We identified almost 80 different genes with mitochondria-related annotations in the list of regulated genes. Surprisingly, most of them (87%) were induced, including genes coding for components the respiratory chain complexes I [nicotin-

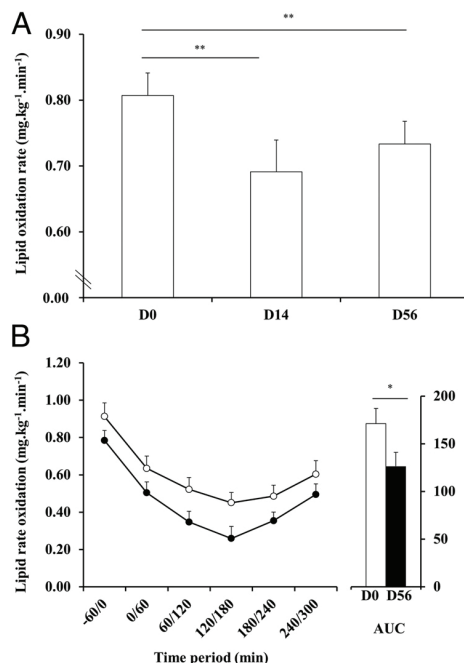


Figure 1. A, Fasting lipid oxidation rates measured by indirect calorimetry during overfeeding ($n = 39$). B, Lipid oxidation rates during the test meal before (open symbols) and after 56 days (closed symbol) of overfeeding ($n = 12$) and the corresponding areas under the curve. Data are means \pm SEM. *, $P < .05$; **, $P < .01$.

1. L'impact d'une surnutrition hyperlipidique sur le muscle squelettique (étude n°1)

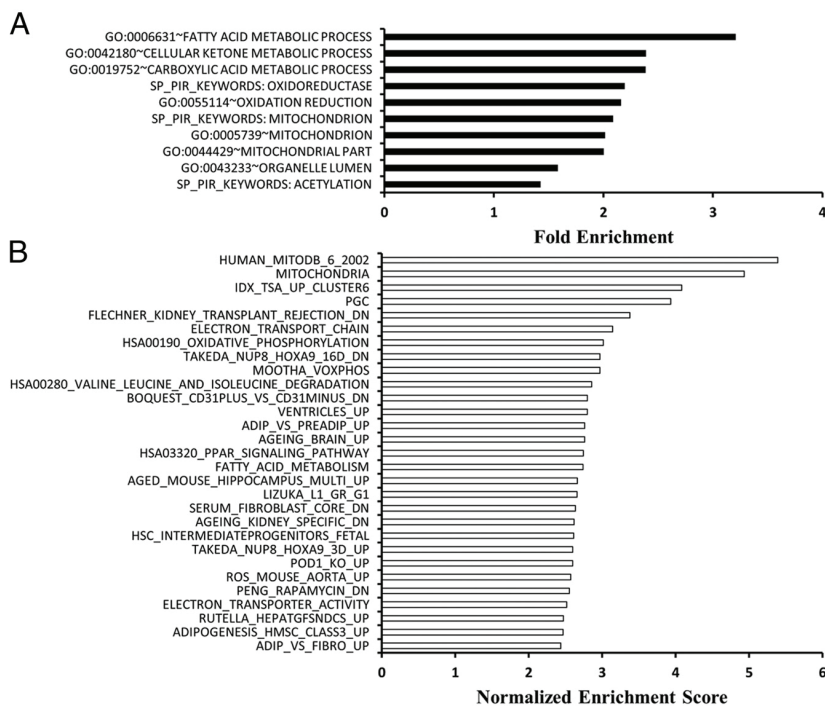


Figure 2. Pathway enrichment in the microarray data set using DAVID (A) and GSEA (B) methods. For panel A, only the 10 most significant pathways are displayed (adjusted $P < .05$). For panel B, only gene set with an adjusted $P < .05$ and a fold enrichment greater than 2 are shown.

amide adenine dinucleotide hydroxide dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1 (*NDUFS1*), II [electron transferring flavoprotein dehydrogenase (*ETFHDH*)], III [ubiquinol cytochrome c reductase, complex III subunit X (*UQCRI0*), coenzyme Q6 monooxygenase (*COQ6*)], and V [ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor (*ATPAF1* and *ATPAF2*)]. Furthermore, several genes involved in the regulation of mitochondrial genome transcription were similarly induced, such as the polymerase- γ 1 polymerase (DNA directed- γ (*POLG*)), six different mitochondrial ribosomal proteins (mitochondrial ribosomal protein-L12, -L19, -S5, -S17, -S22, and -S25), and some regulatory factors (Ts translation elongation factor, mitochondrial and mitochondrial nucleoid factor 1). Together with the induction of key genes of cardiolipin synthesis [cardiolipin synthase 1 (*CRLS1*) and protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1 (*PTPMT1*)], these observations suggested that overfeeding was associated with mitochondrial biogenesis. We confirmed this hypothesis by measuring the variation in the relative amount of mitochondrial DNA in muscle samples by PCR. We found that the ratio of cytochrome C oxidase subunit I (COX1, mitochondrial genome), on peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A, nuclear genome) DNA was significantly increased after 56 days of overfeeding in skeletal muscle (+27%, $P = .022$).

We further measured mitochondria respiration in permeabilized muscle fibers. As shown in Figure 3A, state 3

respiration in the presence of glutamate, malate and succinate was significantly higher after 56 days of overfeeding. Interestingly, state 4 respiration was also increased, leading to significant decrease of the respiratory control ratio (state 3/state 4 respiration) (Figure 3B), which may suggest increased uncoupling of mitochondrial respiration during overfeeding. Interestingly we found a significant increase of UCP3 protein (Figure 3C) and mRNA levels (Table 2) after overfeeding.

Recently the SIRT1-PGC-1 α pathway has emerged as a central regulatory player of mitochondria biogenesis (14, 27). Neither SIRT1 nor PGC-1 α transcripts were retrieved in the microarray list of significantly regulated genes, in contrast to the mitochondrial sirtuin isoform SIRT3. Using RT-qPCR, we confirmed SIRT3 mRNA increase and a slight increase of SIRT1 expression (Table 2). Be-

cause activation of PGC-1 α requires its deacetylation by SIRT1, we measured the acetylation level of PGC-1 α . As shown in Figure 4A, PGC-1 α acetylation was double after 56 days of overfeeding ($P = .003$, $n = 7$), suggesting a lower activity of the deacetylase. Because SIRT1 activity depends on NAD $^{+}$ bioavailability, we measured the NAD $^{+}$ concentration in muscle samples and found that total NAD $^{+}$ content was significantly reduced after overfeeding (Figure 4B). Furthermore, a global Western blot analysis of total acetylated proteins revealed a tendency for a higher acetylation after overfeeding (+39%, $P = .09$, $n = 4$, not shown) in agreement with a lower global deacetylation activity.

Discussion

Over the past 25 years, a number of overfeeding studies have demonstrated that under conditions of positive energy balance, most excess energy is stored, whereas energy expenditure is only minimally stimulated (1, 3–5). The molecular events that occur in adipose tissue, supporting lipid storage and weight gain, have been documented (6–8). In the present study, we took advantage of a large overfeeding study conducted in healthy men (8, 16) to investigate the molecular adaptation taking place in the skeletal muscle of volunteers subjected to a lipid-enriched

1. L'impact d'une surnutrition hyperlipidique sur le muscle squelettique (étude n°1)

doi: 10.1210/jc.2013-4379

jcem.endojournals.org E1259

Table 2. Validation of Microarray Results by RT-qPCR in Skeletal Muscle Samples From 20 Subjects

| Gene names | Gene Symbol | Microarray | | RT-qPCR | |
|---|---------------|-------------|---------|-------------|---------|
| | | Fold Change | P Value | Fold Change | P Value |
| Lipid metabolism | | | | | |
| Fatty acid binding protein 3 | <i>FABP3</i> | 1.24 | .019 | 1.34 ± 0.15 | .038 |
| Acetyl-CoA carboxylase-α | <i>ACACA</i> | 1.17 | .001 | 1.14 ± 0.07 | .053 |
| Stearyl-CoA desaturase | <i>SCD</i> | 3.00 | .002 | 4.52 ± 1.65 | .0003 |
| Diacylglycerol O-acyltransferase 2 | <i>DGAT2</i> | 1.25 | .003 | 1.78 ± 0.30 | .033 |
| Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase-α subunit | <i>HADHA</i> | 1.15 | .002 | 1.23 ± 0.08 | .005 |
| Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 | <i>PDK4</i> | 0.80 | .017 | 0.80 ± 0.12 | .018 |
| Carnitine palmitoyltransferase 1 (muscle isoform) | <i>CPT1</i> | 1.01 | .799 | 1.14 ± 0.09 | .272 |
| Malonyl-CoA decarboxylase | <i>MYLCD</i> | 1.11 | .687 | 1.15 ± 0.11 | .756 |
| Uncoupling protein 3 | <i>UCP3</i> | 0.99 | .191 | 1.23 ± 0.10 | .038 |
| Metabolic regulators | | | | | |
| PPARγ coactivator 1α | <i>PGC-1α</i> | 0.96 | .237 | 1.13 ± 0.11 | .495 |
| Peroxisome proliferator-activated receptor-α | <i>PPARα</i> | 1.09 | .008 | 1.08 ± 0.06 | .432 |
| Peroxisome proliferator-activated receptor-β | <i>PPARβ</i> | 0.97 | .367 | 1.03 ± 0.07 | .708 |
| Polymerase (DNA directed)-γ1 | <i>POLG1</i> | 1.10 | .002 | 1.16 ± 0.07 | .044 |
| Sirtuin 1 | <i>SIRT1</i> | 0.98 | .507 | 1.16 ± 0.05 | .010 |
| Sirtuin 3 | <i>SIRT3</i> | 1.13 | .007 | 1.20 ± 0.07 | .005 |

Data are mean ± SEM.

diet providing a daily 30% energy excess (3180 kJ/d in excess) for 56 days. In agreement with previous studies (3, 4), energy expenditure increased only slightly, whereas the subjects significantly gained weight and fat mass. Importantly, total lipid oxidation rate was markedly decreased during overfeeding, both in the fasting and nonfasting

conditions, indicating a change in fuel partitioning. This observation, in line with a preceding report (4), confirmed a pilot study in which we previously documented reduced fasting NEFAs and lipid oxidation rate after 28 days of lipid overfeeding (17). The reduction in fasting plasma NEFA levels reflects an inhibition of lipolysis in adipose tissue and is thus consistent with a whole-body metabolic reorientation toward lipid deposition rather than their use as fuel substrates.

Using an Affymetrix microarray, we investigated the global regulation of gene expression in skeletal muscle. Several genes related to lipid metabolism, including lipid transport and uptake, intracellular synthesis of fatty acids, and triacylglycerol storage, were induced during overfeeding. This observation supports the preferential orientation of the metabolism toward lipid storage, even in skeletal muscle, during overfeeding (17).

The present study also provides potential molecular mechanisms underlying the shift from fatty acid to glucose oxidation observed during overfeeding. The major mechanism known to control fuel partitioning is the regulation of PDH activity through phosphorylation/dephosphorylation balance (26). The main regulator is PDK4, which inactivates PDH by phosphorylation, preventing the entry of pyruvate into the mitochondria and thus glucose oxidation. We found that lipid overfeeding is associated with a significant reduction in PDK4 mRNA expression in skeletal muscle, which should in turn result in the activation of PDH, providing thus a plausible explanation for the change in fuel partitioning. Regarding the factors responsible for PDK4 regulation, it has been demonstrated that PDK4 expression is dependent on the

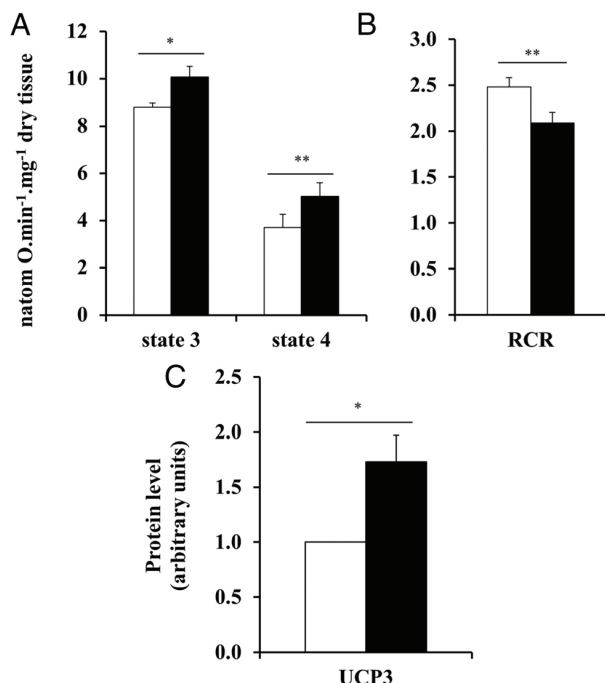


Figure 3. Mitochondrial respiration rates (A) and respiratory control ratio (RCR; B) measured on permeabilized muscle fibers at day 0 (open bars) and at day 56 (closed bars) (n = 16) are shown. C, Protein expression level of UCP3 measured by Western blotting and expressed as arbitrary units take the value measured at day 0 as 1 (n = 7). Data are means ± SEM. *, P < .05; **, P < .01.

1. L'impact d'une surnutrition hyperlipidique sur le muscle squelettique (étude n°1)

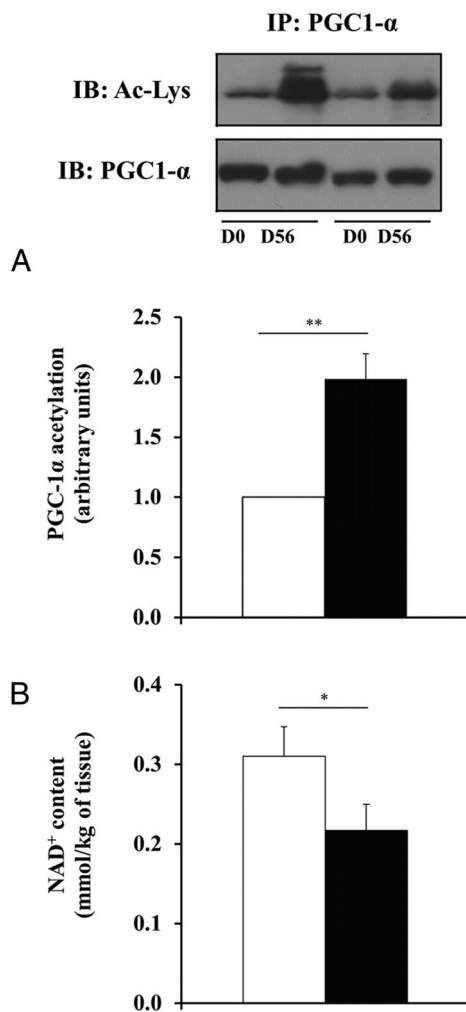


Figure 4. PGC-1 α acetylation (A) and NAD⁺ content in muscle biopsies (B) at day 0 (open bars) and at day 56 (closed bars) (n = 7). Acetylated PGC-1 α and total PGC-1 α levels were determined by Western blotting after PGC-1 α immunoprecipitation. For panel A, representative experiments of two subjects are shown, and data are presented as arbitrary units take the value measured at day 0 as 1 (n = 7). Data are means \pm SEM. *, $P < .05$; **, $P < .01$.

activation of PGC-1 α , which can interact with several transcription factors, such as peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR)- α , estrogen-related receptor- α , or Forkhead box O1, all activators of *PGC-1 α* transcription (28, 29). During food deprivation or fasting, the activation of PGC-1 α is mediated by its deacetylation by SIRT1, which is now viewed as a metabolic sensor controlling the transcription program of fatty acid oxidation (14). In agreement with this mechanism, we found that during overfeeding, as a mirror image of fasting, PGC-1 α was hyperacetylated. This could be the consequence of lower SIRT1 activity due to a reduction of the NAD⁺ availability in skeletal muscle, although inhibition of other deacetylases than SIRT1 could not be excluded. Altogether these data suggest that reduced PGC-1 α action dur-

ing overfeeding could have contributed to lower PDK4 expression and decreased lipid oxidation in skeletal muscle.

The transcription factor responsible for PDK4 gene regulation cannot be identified in this type of study, but we showed that PPAR α and - β are readily expressed in human muscle. Interestingly, it has recently been reported that PPAR α activity can be repressed by the binding of hyperacetylated PGC-1 α (30). This could provide a likely explanation for a lower PPAR α transcriptional activity and, as a consequence, reduction of PDK4 expression and of lipid oxidation.

Another mechanism that may have contributed to the inhibition of fatty acid oxidation during overfeeding is the regulation of carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT1) by malonyl-CoA (31). The observed increased expression of ACACA, the enzyme responsible for malonyl-CoA formation, suggests that this hypothesis could not be ruled out. Additional studies to document the phosphorylation and activity of PDH and the regulation of ACACA are needed to confirm these mechanisms.

The SIRT1-PGC-1 α pathway is also known to directly control a complex transcriptional program of mitochondria-related genes, including the regulation of *OXPPOS* genes, but also numerous genes involved in mitochondria biogenesis (10, 27). Activation of PGC-1 α in myotubes increases oxidative capacity and mitochondrial number and size (9). Because the SIRT1-PGC-1 α pathway appeared inhibited during lipid overfeeding in skeletal muscle, one could have speculated a reduced mitochondrial biogenesis, as observed in the muscle of subjects submitted to an isoenergetic lipid-enriched diet for 3 days (32). We found, in contrast, a concerted up-regulation of approximately 80 genes related to mitochondria after 56 days of overfeeding. These genes are involved in various mitochondrial functions, including the different respiratory chain complexes, cardiolipin synthesis, mitochondrial transporters, and mitochondrial DNA replication/transcription. Increase mitochondria biogenesis was further confirmed by measuring mitochondrial DNA and mitochondrial respiration in permeabilized fibers. Increased UCP3 protein level is also consistent with mitochondrial activation. However, this overfeeding-associated mitochondrial induction occurred in a situation of reduced SIRT1-PGC-1 α pathway. Among the potential mechanisms, the nuclear respiratory factors (NRF1, NRF2) and the nuclear-encoded mitochondrial transcription factor A could contribute to mitochondrial biogenesis (27). Alternatively, the induction of carbohydrate oxidation at the expense of lipids in response to the reduction of PGC-1 α activity could be responsible for mitochondrial activation.

Interestingly, it has been recently shown that the phosphorylation of PGC-1 α could separate its function on gluconeogenic and mitochondrial genes in liver (33). Acetylation in the context of fat overflow might eventually determine its role between fuel oxidation, lipid storage, and mitochondrial functions. With the material available, we were not able to better decipher the mechanisms, and thus, further work is now required to completely demonstrate the potential role of PGC-1 α as the metabolic switch in the control of fuel partitioning in skeletal muscle during overfeeding.

In a recent study, induction of mitochondrial complexes of the electron transport chain was observed in muscle after 3 days of overfeeding (+5225 kJ/d) with a diet enriched in both carbohydrates and lipids (34). Consistent with our results, this induction of mitochondrial biogenesis occurred together with a reduction in fatty acid oxidation and reduced fasting NEFA levels (34). However, these effects were transitory and were not detectable after 28 days of intervention, contrasting with our data showing maintenance of the metabolic changes after 56 days of lipid overfeeding. The reasons for these differences are not known and likely related to the different diets, highlighting the importance of the source of energy fuels in the adaptive mechanisms that could occur in skeletal muscle during positive energy balance.

Our work presents a number of limitations related to the number of subjects, the fact that only men were involved, the duration of the intervention, and the fact that we were not able to verify all the gene expression changes at the protein level. However, the functional measurements (lipid oxidation by indirect calorimetry, mitochondrial respiration in permeabilized fibers) supported the hypotheses made on the basis of the transcriptome analysis. Furthermore, the combination of physiological measurements with gene expression, protein acetylation and functional respiration assay in biopsies allowed a global characterization of the mechanisms involved in fuel partitioning and metabolic adaptations in muscle during lipid overfeeding in healthy men.

In conclusion, we confirmed that skeletal muscle adaptation in response to lipid overfeeding is characterized by a metabolic shift toward lipid accumulation and reduced fatty acid oxidation. We showed that reduction of fatty acid oxidation is associated with PDK4 down-regulation potentially dependent on an inhibition of the SIRT1-PGC-1 α pathway and reduced NAD⁺ content in muscle. Concomitantly, mitochondrial gene expression and oxidative capacities were induced. Our results provide therefore important information to understand the mechanisms behind fuel partitioning and mitochondrial dynamics in skeletal muscle during positive energy balance

in healthy men. Alterations in these adaptive processes could contribute to inappropriate weight gain and obesity complications.

Acknowledgments

We thank the medical staff and nurses (Rhône-Alpes and Auvergne Human Nutrition Research Centers) for their skillful assistance. Dr Jocelyne Draï is acknowledged for her contributions to the metabolic analyses. We also particularly thank Dr Ali Ait Hssain for his assistance. All the volunteers are deeply acknowledged for their invaluable contribution to the study.

The clinical trial registration number is NCT00905892 and is registered at clinicaltrials.gov.

Contributions of the authors include the following: H.V. and M.L. conceived and designed the study. M.A., S.L.-P., E.C., and B.M. recruited the patients and performed the overfeeding protocol. M.A., E.C., E.D., and E.B. acquired the clinical and biological samples and data. K.S., E.M., E.L., J.B., and H.V. performed the genomic analysis and interpretations. C.C. realized the PGC-1 α and NAD⁺ analyses in the muscle samples. B.M. and J.R. performed the respiration measurements and Western blots. All of the authors interpreted and discussed the data. K.S., H.V., and M.L. wrote the manuscript. All of the authors approved the final version of the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Hubert Vidal, INSERM Unité 1060, Faculté de Médecine Lyon Sud, BP12, F-69921 Oullins, France. E-mail: hubert.vidal@univ-lyon1.fr; and Martine Laville, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Hôpital Lyon-Sud, F-69310 Pierre Bénite, France. E-mail: martine.laville@chu-lyon.fr.

This work was supported by research grants from the Hospices Civils de Lyon (Actions Incitatives); from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique Interregional; from the Agence Nationale de la Recherche (Programme de Recherche en Nutrition Humaine and the Programme National de Recherche en Alimentation); and from the Innovation Stratégique Industrielle program of the Agence pour l'Innovation OSEO (Innovation Thérapeutique – Diabète project). K.S. and M.A. were recipients of a doctoral fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France).

Present address for C.C.: Nestle Institute of Health Sciences S.A., EPFL campus, Quartier de l'Innovation, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

Disclosure Summary: The authors have nothing to declare.

References

1. Norgan NG, Durnin JV. The effect of 6 weeks of overfeeding on the body weight, body composition, and energy metabolism of young men. *Am J Clin Nutr*. 1980;33:978–988.
2. Bouchard C, Tremblay A, Després JP, et al. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med*. 1990;322:1477–1482.
3. Tremblay A, Després JP, Thériault G, Fournier G, Bouchard C.

1. L'impact d'une surnutrition hyperlipidique sur le muscle squelettique (étude n°1)

- Overfeeding and energy expenditure in humans. *Am J Clin Nutr.* 1992;56:857–862.
4. Horton TJ, Drougas H, Brachey A, Reed GW, Peters JC, Hill JO. Fat and carbohydrate overfeeding in humans: different effects on energy storage. *Am J Clin Nutr.* 1995;62:19–29.
 5. Diaz EO, Prentice AM, Goldberg GR, Murgatroyd PR, Coward WA. Metabolic response to experimental overfeeding in lean and overweight healthy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 1992;56:641–655.
 6. Shea J, French CR, Bishop J, et al. Changes in the transcriptome of abdominal subcutaneous adipose tissue in response to short-term overfeeding in lean and obese men. *Am J Clin Nutr.* 2009;89:407–415.
 7. Franck N, Gummesson A, Jernås M, et al. Identification of adipocyte genes regulated by caloric intake. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E413–E418.
 8. Alligier M, Meugnier E, Debard C, et al. Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E183–E192.
 9. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell.* 1999;98:115–124.
 10. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 2003;24:78–90.
 11. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature.* 2005;434:113–118.
 12. Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J.* 2007;26:1913–1923.
 13. Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature.* 2009;458:1056–1060.
 14. Cantó C, Auwerx J. Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacol Rev.* 2012;64:166–187.
 15. Chau MDL, Gao J, Yang Q, Wu Z, Gromada J. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1 α pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:12553–12558.
 16. Alligier M, Gabert L, Meugnier E, et al. Visceral fat accumulation during lipid overfeeding is related to subcutaneous adipose tissue characteristics in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:802–810.
 17. Meugnier E, Bossu C, Oliel M, et al. Changes in gene expression in skeletal muscle in response to fat overfeeding in lean men. *Obesity (Silver Spring).* 2007;15:2583–2594.
 18. Alliot X, Saulais L, Seyssel K, et al. An isocaloric increase of eating episodes in the morning contributes to decrease energy intake at lunch in lean men. *Physiol Behav.* 2013;110–111:169–178.
 19. Laville M, Auboeuf D, Khalifallah Y, Vega N, Riou JP, Vidal H. Acute regulation by insulin of phosphatidylinositol-3-kinase, Rad, Glut 4, and lipoprotein lipase mRNA levels in human muscle. *J Clin Invest.* 1996;98:43–49.
 20. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. Affy—analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics.* 2004;20:307–315.
 21. Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004;3:Article3.
 22. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:15545–15550.
 23. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:1–13.
 24. Saks VA, Veksler VI, Kuznetsov AV, et al. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Mol Cell Biochem.* 1998;184:81–100.
 25. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, et al. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest.* 2008;118:789–800.
 26. Holness MJ, Sugden MC. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:1143–1151.
 27. Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23:459–466.
 28. Pilegaard H, Neufer PD. Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise. *Proc Nutr Soc.* 2004;63:221–226.
 29. Wende AR, Huss JM, Schaeffer PJ, Giguère V, Kelly DP. PGC-1 α coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERR α : a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Mol Cell Biol.* 2005;25:10684–10694.
 30. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab.* 2009;9:327–338.
 31. McGarry JD. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system: its broadening role in fuel homeostasis and new insights into its molecular features. *Biochem Soc Trans.* 1995;23:321–324.
 32. Sparks LM, Xie H, Koza RA, et al. A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes.* 2005;54:1926–1933.
 33. Lustig Y, Ruas JL, Estall JL, et al. Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1 α through S6 kinase. *Genes Dev.* 2011;25:1232–1244.
 34. Samocha-Bonet D, Campbell LV, Mori TA, et al. Overfeeding reduces insulin sensitivity and increases oxidative stress, without altering markers of mitochondrial content and function in humans. *PLoS One.* 2012;7:e36320.

1.3 Discussion

Notre modèle de surnutrition hyperlipidique a induit chez nos sujets une augmentation du poids corporel de +2.6 kg dont la moitié est un gain de masse maigre et l'autre moitié un gain de masse grasse. Ces résultats sont cohérents avec la plupart des études de surnutrition qui révèlent une augmentation de la masse maigre et de la masse grasse durant une période de balance énergétique positive apportant une quantité suffisante de protéines (Dériaz *et al.* 1992; Horton *et al.* 1995). L'étude de Bray *et al.* met en avant l'importance de l'apport protéique, en condition de balance énergétique positive, afin de permettre une augmentation de la masse maigre. Ils démontrent ainsi que si l'apport protéique est insuffisant, la prise de poids sera moindre et que cette différence est due à l'évolution de la masse maigre (Bray *et al.* 2012). Nous avons démontré, dans notre étude, que la surnutrition induit une augmentation des volumes de tissu adipeux viscéral et sous-cutané ainsi que du pourcentage de lipides intrahépatiques et intramusculaires (données non présentées). Bien que la dépense énergétique de repos augmente légèrement, l'oxydation des substrats a été profondément modifiée par la surnutrition hyperlipidique avec une hausse de l'oxydation des glucides au détriment de l'oxydation des lipides. Ce phénomène a été retrouvé aussi bien à jeun qu'en période post-prandiale. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, cette observation semble commune à une période de balance énergétique positive indépendamment du type de surnutrition. Il apparaît alors qu'une des adaptations métaboliques du corps humain face à un excès calorique est de réorienter les lipides vers le stockage plutôt que de les utiliser comme source d'énergie, ce qui est cohérent avec une baisse de la lipolyse reflétée par la baisse de la concentration en AGL.

Grâce à la technique de puce à ADN, nous avons évalué l'effet de la surnutrition hyperlipidique sur l'expression génique globale du muscle squelettique. Nos données supportent l'orientation de lipides vers le stockage au niveau du muscle squelettique avec l'induction de nombreux gènes liés au métabolisme des lipides. Nous avons mis en évidence l'induction de gènes liés à la captation, au transport et au stockage des lipides. Nous discuterons plus en détail de ces gènes dans le chapitre 5. Nous avons déjà démontré ce même phénomène au niveau du tissu adipeux sous-cutané (Alligier *et al.* 2012; Alligier *et al.* 2013) chez ces mêmes sujets. Nous avons ensuite cherché à identifier le mécanisme

1. L'impact d'une surnutrition hyperlipidique sur le muscle squelettique (étude n°1)

moléculaire sous-jacent nous permettant d'expliquer la baisse de l'oxydation lipidique en s'intéressant tout particulièrement aux acteurs clés régulant l'orientation des substrats. Nous nous sommes alors tout particulièrement intéressés à l'expression génique des enzymes clés régulant l'oxydation des substrats avec, d'un côté l'expression de la PDH et de ses deux régulateurs PDK4 et PDP, et d'un autre côté l'expression de CPT1 associée à l'expression des deux enzymes régulant la quantité de malonyl-CoA, l'ACACA et MLYCD. Bien que les niveaux d'ARNm de la PDH, de CPT1 et de MLYCD n'aient pas été modifiés par la surnutrition au sein du muscle squelettique, nous avons identifié deux mécanismes complémentaires pouvant expliquer l'augmentation de l'oxydation des glucides et la baisse de l'oxydation des lipides. En effet, nous avons mis en évidence une sur-expression de l'ACACA, enzyme permettant la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA. Cette augmentation peut contribuer à élever les niveaux intracellulaires en malonyl-CoA connu pour être un puissant inhibiteur de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie par CPT1, nous fournissant alors une explication moléculaire de la baisse de l'oxydation des lipides (McGarry *et al.* 1977; McGarry 1998). D'un autre côté, nous avons montré que la surnutrition induit une sous-expression de PDK4, enzyme qui inhibe l'activité de la PDH (Holness and Sugden 2003). Ainsi, une baisse de l'expression de PDK4 contribue à augmenter l'activité de la PDH pouvant expliquer l'augmentation de l'oxydation des glucides. Ces deux mécanismes sont complémentaires et permettent ainsi de coordonner le devenir des substrats énergétiques.

Nous avons ensuite cherché à déterminer le chef d'orchestre permettant de coordonner l'expression génique du muscle squelettique dans ce sens. La voie SIRT1/PGC1 α est maintenant reconnue comme une voie clé permettant la coordination de l'expression de nombreux gènes en fonction du statut énergétique de la cellule. L'activité déacétylase de SIRT1 est dépendante des niveaux en NAD⁺ de la cellule. En condition de restriction calorique, la hausse du contenu intracellulaire en NAD⁺ augmente l'activité de SIRT1 qui déacétyle et active PGC1 α (Wu *et al.* 1999; Gerhart-Hines *et al.* 2007). PGC1 α joue alors son rôle de cofacteur transcriptionnel et permet la sur-expression de nombreux gènes comme PDK4 notamment (Wende *et al.* 2005). Nous avons démontré, dans cette étude, que la surnutrition diminue le contenu en NAD⁺ des cellules musculaires, inhibant ainsi l'activité de SIRT1. L'inhibition de SIRT1 est cohérente avec l'hyperacétylation de PGC1 α que nous avons

1. L'impact d'une surnutrition hyperlipidique sur le muscle squelettique (étude n°1)

retrouvée. Ainsi il semble que la surnutrition, en modulant les niveaux intracellulaires en NAD^+ , inhibe la voie SIRT1/PGC1 α permettant une hausse de l'oxydation des glucides. Néanmoins, PGC1 α est aussi connu pour réguler la biogénèse mitochondriale en activant NRF1 ou encore TFAM (Wu *et al.* 1999). L'inactivation de la voie SIRT1/PGC1 α aurait alors dû induire une baisse de la biogénèse mitochondriale au niveau musculaire, ce qui n'est pas le cas dans notre étude puisque nous retrouvons l'induction de nombreux gènes liés à la mitochondrie et une augmentation de la capacité oxydative du muscle squelettique comme cela a été retrouvé de façon transitoire dans une autre étude de surnutrition (Samocha-Bonet *et al.* 2012). Il semble donc que l'inactivation de PGC1 α par acétylation ne régule qu'une partie de son action métabolique et qu'il existe un autre niveau de régulation de PGC1 α permettant de subdiviser ses effets sur la régulation de l'expression des gènes de l'orientation métabolique et de la biogénèse mitochondriale. Récemment, Lustig *et al.* ont démontré que, dans le foie, la phosphorylation de PGC1 α est capable de séparer sa fonction sur la régulation des gènes de la néoglucogénèse et de la mitochondrie (Lustig *et al.* 2011). D'autres études sont nécessaires pour vérifier si une telle régulation existe au niveau du muscle squelettique.

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

2.1 Introduction

Le fructose, qui est à l'origine le sucre du fruit, est maintenant produit de manière industrielle à partir de différents procédés enzymatiques. La source majeure de fructose dans notre alimentation, mis à part la consommation de fruit, est due à la consommation de soda. De nombreuses études épidémiologiques révèlent que la consommation de soda est associée au développement de pathologie tel que l'obésité (Bray *et al.* 2004; Mozaffarian *et al.* 2011), la stéatose (Assy *et al.* 2008), le diabète (Schulze *et al.* 2004) et la dyslipidémie (Welsh *et al.* 2010).

Chez l'Homme, les études de surnutrition en fructose démontrent que le fructose induit de manière rapide (4 à 7 jours) des effets métaboliques délétères semblables à ceux retrouvés chez des sujets obèses, comme une accumulation ectopique de lipides dans le foie et dans le muscle squelettique associé à une insulino-résistance hépatique (Faeh *et al.* 2005; Couchepin *et al.* 2008; Lê *et al.* 2009; Ngo Sock *et al.* 2010; Lecoultre *et al.* 2014). Sanhope *et al.* ont démontré, sur une plus longue période (10 semaines), que le fructose, au contraire du glucose, induit une insulino-résistance hépatique, une accumulation de tissu adipeux viscéral et une lipogénèse hépatique. De plus, le fructose, même consommé de manière isocalorique pendant 4 jours, induit une élévation de la glycémie et une hausse des triglycérides sanguins (Egli *et al.* 2013).

Bien que le fructose et le glucose apportent la même quantité d'énergie à l'organisme (4 kcal/g), le fructose n'est pas assimilé de la même façon que le glucose au niveau intestinal et possède un métabolisme hépatique particulier (Bizeau and Pagliassotti 2005). Le fructose est efficacement extrait par le foie grâce à l'activité de la fructokinase possédant une forte affinité pour le fructose, qui est l'enzyme qui phosphoryle le fructose en fructose 1-phosphate. De plus, le fructose est rapidement métabolisé par le foie car il outrepassé les deux enzymes clés régulant le début de la glycolyse que sont l'hexokinase et la phosphofruktokinase (Tappy and Lê 2010). Après une charge en fructose, l'augmentation de la concentration sanguine en fructose est très faible (de l'ordre de quelques $\mu\text{mol/L}$), c'est pourquoi ses effets sur l'organisme sont très certainement médiés de façon indirecte.

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

Dans une précédente étude (Lê *et al.* 2009), nous avons démontré que la surconsommation de fructose (+3.5g de fructose par kg de masse maigre par jour) est à l'origine d'un changement drastique de l'oxydation des nutriments, avec une baisse marquée de l'oxydation de lipides, contribuant à une accumulation ectopique de lipides au niveau du muscle squelettique chez des sujets sains et des sujets apparentés diabétiques de type 2. Nous avons donc souhaité identifier, lors d'une surnutrition en fructose de 7 jours chez des sujets apparentés diabétiques de type 2, les mécanismes moléculaires prenant place dans le muscle squelettique, grâce à l'utilisation de puces ADN. Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à l'expression de gènes liés aux métabolismes des glucides et des lipides ainsi qu'aux gènes de la mitochondrie. Nous avons aussi souhaité identifier les facteurs régulateurs pouvant expliquer les effets du fructose. De plus, nous avons étudié, par approche *in vitro*, quel pourrait être le messenger médiant les effets du fructose.

2.2 Article 2 : Fructose overfeeding in first-degree relatives of type 2 diabetic patients impacts energy metabolism and mitochondrial functions in skeletal muscle

Article 2 : Une surnutrition en fructose impacte le métabolisme énergétique et la fonction mitochondriale du muscle squelettique de sujets apparentés diabétiques de type 2

K. Seyssel, E. Meugnier, K.A Lê, E. Disse, E. Blond, L. Pays, S. Nataf, J. Brozek, H. Vidal, L. Tappy et M. Laville

Soumis en 2015 à Diabetes Metabolism and Obesity

1 **Fructose overfeeding in first-degree relatives of type 2 diabetic patients**
2 **impacts energy metabolism and mitochondrial functions in skeletal muscle.**

3
4 **K. SEYSSEL^{1,2}, E. MEUGNIER^{1,3}, K.A LÊ⁴, E. DISSE^{1,2}, E. BLOND^{1,2}, L. PAYS^{1,3,6}, S. NATAF**
5 **^{1,3,6}, J. BROZEK⁵, H. VIDAL^{1,2,3}, L. TAPPY⁴ and M. LAVILLE^{1,2,3},**

6
7 ¹ Lyon 1 University, INSERM UMR1060, CarMeN Laboratory and CENS, Oullins, France,

8 ² CRNH Rhône-Alpes, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre Bénite, France,

9 ³ INRA Unit-1397, Oullins, France,

10 ⁴ Department of Physiology, Faculty of Biology and Medicine, University of Lausanne, Lausanne,
11 Switzerland

12 ⁵ Genfit, F-59120 Loos, France

13 ⁶ Banque de Cellules et de Tissus, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

14
15 **Abbreviated title:** transcriptomic response to high fructose diet in muscle

16
17 **Keywords:** High fructose diet, skeletal muscle, gene regulation, energy metabolism, lipid oxidation

18
19 **Word count: Abstract (242 words); Article (3496 words; 3 figures and 2 tables; 38 references)**

20
21 **Corresponding authors:**

22 Martine Laville, INSERM U1060, Faculté de médecine Lyon Sud, BP12, F-69921 Oullins, France.

23 Tel: 33 4 26 23 59 18, e-mail: martine.laville@univ-lyon1.fr

24
25 **Grants support:** Supported by grants 310000-109737/1 from the Swiss National Science Foundation,
26 and by research grants from the Hospices Civils de Lyon (Actions Incitatives) and from the ISI
27 program of Agence pour l'Innovation OSEO (IT-DIAB project). K.S. was a recipient of a doctoral
28 fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France.

29
30 **Contribution statement:** LT and KAL conceived, designed the study, recruited the patients and
31 performed the protocol. KS, KAL, LT, ED, EB and ML acquired clinical and biological samples and
32 analysed the data. KS, EM, JB and HV performed genomic analysis and interpretations. LP and SN
33 realized bioinformatics analyses of microarray data. All authors discussed data. KS, HV and ML wrote
34 the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript

35
36 **Disclosure summary:** The authors declare that they have nothing to disclose

37 **ABBREVIATIONS**

38 HFrD: High-fructose diet

39 CPT1: Carnitine palmitoyltransferase 1

40 HADHA: hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase

41 MLYCD: Malonyl-CoA decarboxylase

42

43 **ABSTRACT**

44

45 **Objective:** The aim of the study was to assess the effects of a high-fructose diet on skeletal muscle
46 transcriptomic response in healthy offspring of patients with type 2 diabetes, a subgroup of individuals
47 prone to metabolic disorders.

48 **Design/Participants/Intervention:** Ten healthy normal weight first-degree relatives of type 2 diabetic
49 patients were submitted to a high-fructose diet (3.5g fructose/kg fat-free mass per day) during 7 days.
50 In parallel to a deep metabolic evaluation, including euglycemic hyperinsulinemic clamp, indirect
51 calorimetry and magnetic resonance spectroscopy, a global transcriptomic analysis was performed on
52 skeletal muscle biopsies combined with *in vitro* experiments using primary myotubes.

53 **Results:** High-fructose diet increased intramyocellular lipids content (+25%) concomitantly with a
54 shift in the use of substrates as energy fuel toward preferential oxidation of carbohydrates instead of
55 lipids. Transcriptomic analysis highlighted profound effects on fatty acid oxidation and mitochondrial
56 pathways supporting this metabolic shift. Bioinformatics tools pointed out possible transcription
57 factors orchestrating this genomic regulation, such as PPAR α and NR4A2. *In vitro* experiments in
58 human myotubes suggested an indirect action of fructose in skeletal muscle, which seemed to be
59 independent from lactate, uric acid and nitric oxide.

60 **Conclusion:** The overconsumption of fructose induced profound changes in fuel partitioning and
61 ectopic lipid accumulation in first-degree relatives of type 2 diabetic subjects. A large cluster of genes
62 related to energy metabolism, mitochondrial function and lipid oxidation were down-regulated, thus
63 supporting the concept that overconsumption of fructose containing foods could contribute to
64 metabolic deterioration in humans.

65

66 **INTRODUCTION**

67 In parallel to the dramatic rise in metabolic diseases and obesity observed over the past fifty
68 years, the generalization of added sugar in processed food led to a marked increase in fructose
69 consumption in almost all countries (1–3), and epidemiological studies demonstrated that the
70 consumption of sugar-sweetened beverage (containing at least 50% of fructose) is associated with the
71 development of obesity (1,4), steatosis (5), diabetes (6) and dyslipidemia (7). The underlying
72 mechanisms, while actively studied over the last 20 years, are still not fully understood. Many studies
73 in animal models demonstrate that high fructose consumption induces lipid accumulation in liver and
74 participates to the establishment of hepatic insulin resistance (8–10). Induction of lipogenesis and
75 increased hepatic insulin resistance in response to fructose are also classically reported in human
76 studies, both during isocaloric diet (11,12) or during overfeeding (13,14). The mechanism by which
77 fructose induces liver steatosis is likely due to its specific metabolism that bypasses the main
78 regulatory step of hepatic glycolysis catalysed by the enzyme phosphofructokinase, and by the
79 activation of the transcription factor sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) that
80 promotes the expression of lipogenesis-related genes in hepatocytes (15,16).

81 Beside the deleterious effects on liver, fructose feeding also strongly alters whole body
82 metabolic homeostasis. Skeletal muscle insulin-resistance, reduced oxidation of fatty acids and lipid
83 accumulation are consistently found after fructose overfeeding in rodent models (17–19), whereas
84 most of the human studies have reported moderated effects (14,20). Nevertheless, lipid accumulation,
85 as measured by proton magnetic resonance spectroscopy (¹H-MRS) (14) and changes in substrate
86 oxidation (13,14,21) have been evidenced in response to fructose load in human volunteers. As
87 fructose is mostly metabolised by the liver and that very low levels of fructose are found in blood, the
88 mechanisms by which high fructose feeding induces alteration of muscle metabolism is globally not
89 well defined. Also, several important blood metabolites, such as uric acid or lactate, and oxidative
90 stress markers could indirectly contribute to the deleterious metabolic effects of fructose (3).
91 Although, altered insulin signalling (18) has been evidenced in rodents, the molecular mechanisms
92 occurring in human muscle and how fructose, directly or indirectly, does impact muscle metabolism
93 remain to be clarified.

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

94 In a preceding nutritional intervention (14) conducted in first degree relatives of type 2
95 diabetic patients, a population known to be at high risk of worsening insulin action during their life
96 and prone to become diabetics (22), we had found that the consumption of 3.5g of fructose/kg of fat
97 free mass per day during 7 days strongly modified the use of substrates as energy fuel, with a
98 preferential oxidation of carbohydrates instead of lipids, leading to ectopic lipid accumulation in
99 skeletal muscle regardless their family history of types 2 diabetes. We therefore took advantage of this
100 study to explore with an unbiased global genomic approach the molecular events taking place in
101 skeletal muscle biopsies. The transcriptomic profiling revealed a marked impact of fructose
102 consumption on a large cluster of genes related to energy metabolism, mitochondrial function and
103 lipid oxidation. Based on these data our strategy to get more insight was 1) to identify transcription
104 factors that may coordinate the *in vivo* regulation of clusters of genes using bioinformatics tools and 2)
105 to use the most regulated genes as read-out markers in primary human myotubes incubated with
106 fructose, uric acid or lactate to test their contribution.
107

108 **MATERIALS AND METHODS**

109

110 **Clinical study** - The present study takes advantage of a previous fructose overfeeding trial (14). The
111 data from 10 of the 16 volunteers having muscle biopsies were used to characterise at the molecular
112 level the effects of fructose. The study design has been described in details (14). Briefly, the subjects
113 were submitted, in a crossover randomized order, to 7 days of control diet and to 7 days of a high-
114 fructose diet (HFrD) at 3.5g/kg fat free mass per day with 4-5 weeks of washout period between the
115 diets. Each subject was studied at two occasions, at the end of the control diet and at the end of the
116 HFrD. Fasting blood samples were drawn for analyses of metabolites and hormones. Indirect
117 calorimetry measurements (ventilated canopy) were performed in the fasting state to determine
118 substrates oxidation and energy expenditure. After this exploration, a percutaneous biopsy of the
119 *vastus lateralis* muscle was performed under local anesthesia (2% Lidocaïne). Then, the subjects
120 underwent a two-step hyperinsulinemic euglycemic clamp to determine hepatic insulin sensitivity and
121 glucose infusion rate. Fat mass was evaluated by measuring subcutaneous skinfold-thickness. Ectopic
122 lipid depositions as intrahepatocellular and intramyocellular lipids contents were evaluated by ¹H-
123 MRS. The local ethic committee approved the study and all participants gave written informed
124 consent. The studies were registered at clinicaltrials.gov as NCT00523562.

125

126 **Microarrays** - RNA profiling was performed in skeletal muscle using Affymetrix Human HG U133
127 Plus 2.0 array as previously described (23,24). One hundred nanograms of total RNA were processed
128 and hybridized with the GeneChip3® IVT Express kit according to the manufacturer's instructions.
129 Chips were scanned with GeneChip Scanner 3000 7G and individually analysed. Expression values
130 and absent/present calls were calculated using MAS 5.0 (Affymetrix, 2002) and RMA expression
131 summary algorithms implemented in R (version 2.9.2) within the affy package (25). Data were filtered
132 on detection calls and statistical analysis was then performed on 32,453 probe sets with Limma
133 package (26). The data set of regulated genes (Supplementary Table 1) has been deposited at the Gene
134 Expression Omnibus database (GSE70218). Biological functions and pathways regulated by fructose
135 diet were identified using DAVID (27).

136

137 **Use of GeneMANIA to identify potential transcription factor coordinating the regulation of gene**
138 **clusters** - The GeneMANIA Cytoscape plugin (Cytoscape 3.2.1, GeneMANIA 3.4.0) (28) was used to
139 build a correlation network, using the delta values (HFrD values minus control values) for each
140 annotated gene and each individual. Then GeneMANIA allowed us to identify the 100 genes that were
141 co-regulated the most with the most fructose-responsive genes retrieved from the microarray analysis
142 (MLYCD, CPT1 and HADHA). Finally, a manual curation of this list allowed us to retrieve
143 transcription factors selected for their possible relevance to the fructose effects.

144

145 **Quantification of mRNA by real-time quantitative PCR (RT-qPCR)** - RT-qPCR assays were
146 performed using a Rotor-Gene 6000 (QIAGEN) in samples from the 10 subjects used for microarrays.
147 Values were normalized using hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT). The studied
148 genes and the primer sequences are available upon request (emmanuelle.meugnier@univ-lyon1.fr).

149

150 **Primary human myotubes experiments** - Myotubes were cultured from human muscle satellite cells
151 (*vastus lateralis*) obtained from four healthy subjects with normal glucose tolerance and insulin
152 sensitivity (2 men/2 women, age: 47±10 years, BMI: 25±2 kg/m²). The experimental protocol was
153 approved by the Ethical Committee SUD EST IV (Agreement 12/111). Primary skeletal myoblasts
154 were purified and differentiated into myotubes according to the previously described procedure
155 (29,30). Briefly, myoblasts were established from muscle satellite cells and proliferated in HAM-F10
156 medium, supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Life Technologies). After
157 reaching confluence, myoblasts were differentiated into myotubes during 7-10 days in DMEM
158 supplemented with 2% FBS.

159

160 **Statistical analyses** - The values are expressed as Mean±Standard Error of Mean (SEM). All tests
161 were two-sided and differences were considered significant at P<0.05. JMP® 9 statistical software
162 (SAS Institute Inc., NC, USA) was used for all the statistical analyses.

163

164 **RESULTS**

165 The anthropometric and metabolic parameters after the control diet and the HFrD of the 10
166 subjects included in this study are summarized in Table 1. In agreement with our preceding published
167 results (14), the seven days of HFrD induced a modest weight gain (+1.01 kg, $p<0.01$) and proton
168 magnetic resonance spectroscopy revealed increases in lipid accumulation in the liver (+74%,
169 $p<0.001$) and in the skeletal muscle (+25%, $p=0.05$). These occurred without significant modification
170 of the percentage of fat mass estimated by subcutaneous skinfold-thickness. In the fasting state,
171 significant reduction of NEFA concentrations were evidenced after HFrD (591 ± 56 to 374 ± 39
172 $\mu\text{mol/L}$; $p<0.001$) associated with an important increase in TG concentrations (0.79 ± 0.1 to 1.39 ± 0.1
173 mmol/L ; $p<0.001$). Uric acid and lactate plasma concentrations were also significantly increased after
174 HFrD (Table 1). HFrD was associated with increased fasting glycemia and insulinemia ($p<0.02$) and
175 with hepatic insulin resistance, as evidenced by a decrease in hepatic insulin sensitivity index
176 ($p=0.02$). Indirect calorimetry revealed a marked shift in the use of substrates as energy fuel with a
177 preferential oxidation of carbohydrates (+42%, $p<0.001$) instead of lipids (-32%, $p=0.001$) (Table 1).
178 This change of whole body fuel partitioning after HFrD suggested major modifications of energy
179 metabolic pathway in skeletal muscle, the tissue mainly responsible for energy expenditure at rest.

180 The main objective of the present study was to go deeper into the molecular events occurring
181 in skeletal muscle using a global analysis of genes expression by microarray in muscle biopsies taken
182 after the control and the fructose diet. Using this strategy, we found 543 probes (corresponding to 407
183 unique genes) significantly regulated by HFrD in the skeletal muscle of the subjects (Supplementary
184 Table 1). Among them, 177 genes were up-regulated while 230 were down-regulated after HFrD.
185 Pathway characterization using DAVID, showed that HFrD mainly affected pathways linked to lipid
186 metabolism in muscle and to a lower extend some genes related to extracellular matrix (Figure 1A).

187 When the analysis was focused on the down-regulated genes only, it appeared that HFrD
188 specifically altered sets of genes related to lipid metabolism, fatty acid oxidation and to mitochondria
189 function (Figure 1B). We indeed observed a coordinated down-regulation of genes coding enzymes
190 required to oxidize fatty acids [acyl-CoA dehydrogenase very long chain (ACADVL), acyl-CoA
191 dehydrogenase C2 to C3 short chain (ACADS) and hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

192 thiolase/enoyl-CoA hydratase alpha and beta subunit (HADHA and HADHB) and acetyl-CoA
193 acyltransferase 2 (ACAA2)]. Associated with the down-regulation of these genes essential for the
194 beta-oxidation in mitochondria, we also found a down-regulation of genes coding for essential
195 components of the entry of fatty acids into the mitochondria [carnitine palmitoyltransferase 1B
196 (muscle) (CPT1B) and carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2)]. Moreover, we also found that
197 malonyl-CoA decarboxylase (MLYCD) mRNA level was decreased after HFrD. The HFrD also
198 repressed expression of uncoupling protein 3 (UCP3) and of several genes related to the respiratory
199 chain [cytochrome c, somatic (CYCS), electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide (ETFB),
200 electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH), cytochrome c oxidase subunit IV isoform
201 1 (COX4I1)]. Furthermore, the mRNA level of mitochondrial ribosomal protein L41 (MRPL41)
202 involved in the regulation of mitochondrial genome transcription was also decreased. In a mirror
203 image of the marked reduction of fatty acid catabolism and oxidation in muscle, HFrD was associated
204 with an increase expression of sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) mRNA,
205 which is consistent with the observed increase of intramuscular lipid content measured by ¹H-MRS
206 (Table 1) associated with the induction of some genes related to lipogenesis, such as low density
207 lipoprotein receptor (LDLR) and fatty acid desaturase 2 (FADS2) (Supplementary Table 1). The
208 regulation of the expression of a subset of these genes was confirmed using RT-qPCR as alternative
209 method, validating therefore the microarray data (Table 2).

210 In order to get more insight into the mechanisms that could explain the coordinated down-
211 regulation of lipid metabolism related genes in the muscle during high fructose feeding, we decided to
212 apply GeneMANIA software with the aim of identifying potential transcription factors that may
213 orchestrate the response to fructose in skeletal muscle. GeneMANIA can indeed allow recovering
214 interesting genes that have been missed in the initial statistical screen of the microarray data. For this
215 purpose, we built a network of genes that were co-regulated with CPT1B, MYLCD and HADHA,
216 three genes strongly down-regulated in response to fructose load (Supplementary Table 1 and Table 2)
217 and corresponding to well known key genes of lipid oxidation in muscle. In the network of the top 100
218 genes that are the most co-regulated with these 3 genes, we found 19 transcription factors
219 (Supplementary Table 2). For most of them, no information was available in the literature and in

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

220 databases regarding a potential involvement in muscle biology and in lipid or energy metabolism.
221 However, we found PPAR α and NR4A2 that could be interesting candidates to contribute to the
222 regulation of lipid-related genes in muscle.

223 Then, to better understand by which mechanisms fructose could affect fatty acid oxidation in
224 skeletal muscle, we used primary cell cultures of human myotubes to test the direct effect of fructose
225 *in vitro* on muscle cells. Using various concentration of fructose (0.05 to 2 mM), we found that
226 fructose did not directly regulate the key genes of lipid metabolism in cultured muscle cells. Figure 2
227 shows the results on the expression of CPT1B. Similar lack of effect was found for UCP2 (data not
228 shown).

229 These negative results suggested that fructose might act indirectly in muscle. We then tested
230 uric acid (0.001 to 1 mM) and lactate (0.05 to 2 mM), two circulating metabolites increased *in vivo*
231 upon HFrD (Table 1), as well as a nitric oxide donor (SNAP : S-nitroso-N-acetylpenicillamin, from
232 500 nM to 1 mM) because of the previously proposed mechanisms of action of fructose (3). However,
233 none of these compounds was able to modify the expression of lipid oxidation-related genes such as
234 CPT1 in human myotubes (Figure 2).

235

236 **DISCUSSION**

237 Global food habits have profoundly changed over the past decades with an important increase
238 in fructose consumption, mainly due to the use of added sugar in the processed food (1,2). This
239 overconsumption of fructose has been shown to induce lipogenesis, to increase hepatic liver content
240 and to promote fat gain (3), but whether fructose consumption *per se* could have a peripheral effect on
241 muscle remains debated. Skeletal muscle modification of insulin action and lipid metabolism has been
242 found consistently in rodent (17–19) whereas ectopic lipid accumulation (14) and changes in substrate
243 oxidation (13,14,21) have been evidenced in response to fructose load in human volunteers. We also
244 reported an induction of peripheral insulin resistance after 6 days of HFrD in type 2 diabetic relatives
245 (20). In the present study, we combined an *in vivo* transcriptomic approach in skeletal muscle biopsies
246 and *in vitro* experiments in primary myotubes to get more insight into the molecular mechanisms of
247 fructose effects in muscle. *In vivo*, HFrD induced profound changes in fuel partitioning, with a
248 preferential oxidation of carbohydrates (+42%) instead of lipids (-32%) at the whole body level. A
249 global transcriptomic analysis in skeletal muscle biopsies identified a coordinated down-regulation of
250 clusters of genes related to lipid metabolism and fatty acid oxidation. Using bioinformatics tools, we
251 also pointed out putative transcription factors that could orchestrate this genomic regulation, such as
252 PPAR α and NR4A2. *In vitro* experiments in human myotubes suggested an indirect action of fructose
253 in skeletal muscle, which seemed to be independent from lactate, uric acid and NO.

254 Consistent with previous studies, including our preceding works, high fructose consumption
255 significantly reduces total lipid oxidation rate in the fasting state. The decrease in fasting plasma
256 NEFA levels, likely reflecting an inhibition of lipolysis in adipose tissue, is also consistent with a
257 reorientation of lipid toward storage rather than their use as fuel substrate, as already discussed
258 (14,21,31). This metabolic reorientation was also revealed by ¹H-MRS clearly showing ectopic lipid
259 accumulation in the skeletal muscle and the liver of the volunteers. In line, it was demonstrated in
260 another study that fructose consumed as a part of a balanced diet during 10 weeks is specifically able
261 (compared to glucose) to stimulate hepatic *de novo* lipogenesis in overweight and obese individuals
262 (11). Based on animal studies, some mechanistic insights are already available. Crescenzo et al. (19)
263 demonstrated in rats that high-fructose diet increases triglyceride and ceramide contents in skeletal

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

264 muscle, associated to reduced whole-body glucose tolerance. As mitochondrial biogenesis and
265 mitochondrial coupling were increased in skeletal muscle of fructose fed rats, the authors proposed
266 that fructose-stimulated mitochondrial energetic efficiency could cause oxidative stress, and high lipid
267 peroxidation, contributing to the metabolic disturbances (19). Several studies have shown alteration of
268 the insulin signalling cascade in skeletal muscle of fructose fed rats, with impaired insulin-stimulated
269 IRS-1 phosphorylation, activation of phosphoinositol-3-kinase and Glut 4 translocation (17,18).

270 In the present study, we explored the global regulation of gene expression in skeletal muscle
271 biopsies using Affymetrix microarray. We found that 400 different genes were significantly regulated
272 by 7 days of HFrD in the skeletal muscle of the subjects. The pathways significantly affected were
273 related to lipid and fatty acid oxidation and mitochondria. Among the significantly up-regulated genes,
274 we found the transcription factor SREBP1c, well known as a master regulator of genes involved in
275 lipogenesis and lipid storage in liver, adipose tissue and also in skeletal muscle (32). SREBP1c
276 expression induction during HFrD could contribute to the observed increase of muscle lipid content
277 assessed by ¹H-MRS. At the opposite, several genes coding key enzymes of lipid oxidation and
278 important mitochondrial proteins were markedly down-regulated after the HFrD, fully supporting the
279 observed decrease in lipid oxidation rate and the shift from lipid to carbohydrate oxidation observed *in*
280 *vivo*. Figure 3 recapitulates the pathways and key genes altered in human muscle after HFrD. The
281 limiting step of lipid oxidation is the entry of fatty acid in mitochondria through CPT1 and to a lower
282 extent CPT2 (33). The mRNA expression of both CPT1 and CPT2 was decreased in skeletal muscle
283 after HFrD. Another mechanism contributing to the inhibition of lipid oxidation is the regulation of
284 CPT1 by malonyl-CoA (34). We observed a decrease in MLYCD mRNA, the malonyl-CoA
285 degradation enzyme, further supporting an inhibition of fatty acid oxidation. Furthermore, several
286 genes coding key components of the beta-oxidation pathway in the mitochondria (ACADVL, ACADS,
287 HADHA, HADHB and ACAA2) were also down-regulated after HFrD. In contrast to preceding
288 observations in rats, we found here that high fructose consumption in humans induced a strong down-
289 regulation of several genes related to mitochondrial function (UCP3, respiratory chain-related genes)
290 and biogenesis (MRPL41). These results were in line with a previous study where we found a
291 concerted reduction of fatty acid oxidation- and mitochondrial-related genes in the skeletal muscle

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

292 after 6 days of high fructose feeding (20). In this preceding study, we also evidenced a significant
293 reduction in the mitochondrial respiratory activity after HFrD (20).

294 We then tried to identify potential transcription factors that could orchestrate the concerted
295 regulation of gene expression in response to fructose in muscle. Using GeneMANIA software, we
296 identified a network of 100 genes that were co-regulated with CPT1, MLYCD and HADHA *in vivo*
297 and retrieved several transcription factors. Among them, PPAR α and NR4A2 emerged as interesting
298 candidates to contribute to the down-regulation of fatty acid oxidation-related genes. PPAR α is a well
299 known transcription factor controlling a large set of fatty acid oxidation-related genes, including
300 CPT1, both in hepatocytes and in muscle cells (35). NR4A2 (Nurr1) belongs to the Nr4A subfamily of
301 orphan nuclear receptors that are expressed as early response genes in response to various stimuli
302 including fatty acids, stress or inflammation (36). They are implicated in important biological
303 processes, particularly the response to dietary restriction during which they improve mitochondrial
304 functions and reduce reactive oxygen species production through the regulation of target genes (such as
305 UCP3 and PGC1 α) in skeletal muscle (37). The co-regulation of these two transcription factors with
306 the key genes of fatty acid oxidation, as retrieved by GeneMANIA from the whole transcriptome
307 analysis, suggests that high fructose consumption may lead to an inhibition of their transcriptional
308 activity in human skeletal muscle.

309 Using an *in vitro* approach, we were able to demonstrate that fructose probably does not act
310 directly in skeletal muscle. This conclusion arises from a set of experiments using primary human
311 myotubes showing that incubation with different concentrations of fructose was not able to change the
312 expression of key genes of lipid oxidation. This is in agreement also with the very low concentration
313 of circulating fructose *in vivo*, even after high loads (38). We also tested the hypothesis of an
314 intermediary mediator, such as uric acid, lactate or nitric oxide that are increased after fructose load
315 (3,39). Using the regulation of CPT1B expression as a reporter gene in human myotubes, we did not
316 find any of uric acid and lactate or of a nitric oxide donor (SNAP) used to reproduce potential action
317 of fructose on oxidative stress. Altogether these experiments in cultured human muscle cells suggested
318 an indirect action of fructose on skeletal muscle gene regulation, eventually after being metabolized
319 during its absorption by the intestinal epithelial barrier or by the liver, two tissues known to be able to

320 actively use and metabolize fructose (8). Alternative mechanisms could include a reduction of adipose
321 tissue lipolysis during HFrD, as evidenced by the decreased fasting NEFA levels, which in turn could
322 slow-down PPAR α transcriptional activity and the fatty acid oxidative machinery in muscle.

323 In summary, using a global transcriptomic analysis in skeletal muscle, we provide in the
324 present study novel insights into the molecular pathways that might explain the metabolic
325 consequences of fructose overconsumption in first-degree relatives of type 2 diabetic subjects. We
326 demonstrate a marked impact on a large cluster of genes related to energy metabolism, mitochondrial
327 function and lipid oxidation, thus supporting the concept that overconsumption of fructose containing
328 foods could contribute to metabolic deterioration in humans.

329

330 **ACKNOWLEDGMENTS**

331 All the volunteers are deeply acknowledged for their invaluable contribution to the study.

332

333

REFERENCES

- 334 1. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may
335 play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.* 2004 Apr;79(4):537–43.
- 336 2. Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang D-H, et al. Potential role of sugar
337 (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney
338 disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2007 Oct;86(4):899–906.
- 339 3. Tappy L, Lê K-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol*
340 *Rev.* 2010 Jan;90(1):23–46.
- 341 4. Mozaffarian D, Hao T, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Changes in diet and lifestyle and long-
342 term weight gain in women and men. *N Engl J Med.* 2011 Jun 23;364(25):2392–404.
- 343 5. Assy N, Nasser G, Kamayse I, Nseir W, Beniashvili Z, Djibre A, et al. Soft drink consumption
344 linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Can J Gastroenterol.* 2008
345 Oct;22(10):811–6.
- 346 6. Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, et al. Sugar-
347 sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged
348 women. *JAMA.* 2004 Aug 25;292(8):927–34.
- 349 7. Welsh JA, Sharma A, Abramson JL, Vaccarino V, Gillespie C, Vos MB. Caloric sweetener
350 consumption and dyslipidemia among US adults. *JAMA.* 2010 Apr 21;303(15):1490–7.
- 351 8. Bizeau ME, Pagliassotti MJ. Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metab Clin Exp.* 2005
352 Sep;54(9):1189–201.
- 353 9. Wei Y, Pagliassotti MJ. Hepatospecific effects of fructose on c-jun NH2-terminal kinase:
354 implications for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2004
355 Nov;287(5):E926–33.
- 356 10. Wei Y, Wang D, Pagliassotti MJ. Fructose selectively modulates c-jun N-terminal kinase activity
357 and insulin signaling in rat primary hepatocytes. *J Nutr.* 2005 Jul;135(7):1642–6.
- 358 11. Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, et al. Consuming
359 fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and
360 decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest.* 2009 May;119(5):1322–
361 34.
- 362 12. Egli L, Lecoultre V, Theytaz F, Campos V, Hodson L, Schneiter P, et al. Exercise prevents
363 fructose-induced hypertriglyceridemia in healthy young subjects. *Diabetes.* 2013 Jul;62(7):2259–
364 65.
- 365 13. Faeh D, Minehira K, Schwarz J-M, Periasamy R, Periasami R, Park S, et al. Effect of fructose
366 overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in
367 healthy men. *Diabetes.* 2005 Jul;54(7):1907–13.
- 368 14. Lê K-A, Ith M, Kreis R, Faeh D, Bortolotti M, Tran C, et al. Fructose overconsumption causes
369 dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of
370 type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2009 Jun;89(6):1760–5.
- 371 15. Nagai Y, Nishio Y, Nakamura T, Maegawa H, Kikkawa R, Kashiwagi A. Amelioration of high
372 fructose-induced metabolic derangements by activation of PPARalpha. *Am J Physiol Endocrinol*
373 *Metab.* 2002 May;282(5):E1180–90.

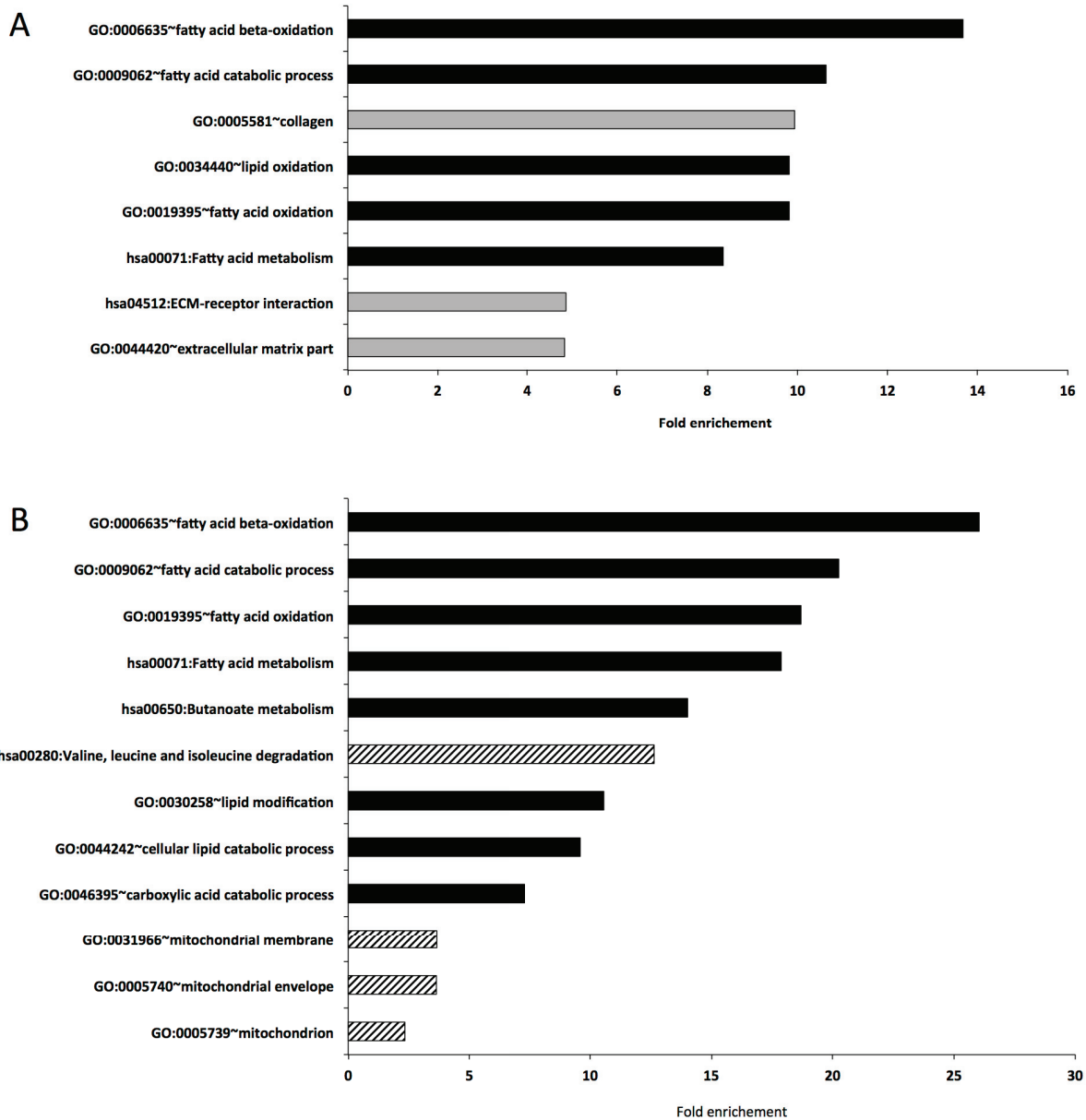
2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

- 374 16. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, et al. Insulin-
375 independent induction of sterol regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of
376 streptozotocin-treated mice. *Diabetes*. 2004 Mar;53(3):560–9.
- 377 17. Bezerra RM, Ueno M, Silva MS, Tavares DQ, Carvalho CR, Saad MJ. A high fructose diet
378 affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J Nutr*. 2000 Jun;130(6):1531–
379 5.
- 380 18. Li P, Koike T, Qin B, Kubota M, Kawata Y, Jia YJ, et al. A high-fructose diet impairs Akt and
381 PKCzeta phosphorylation and GLUT4 translocation in rat skeletal muscle. *Horm Metab Res*.
382 2008 Aug;40(8):528–32.
- 383 19. Crescenzo R, Bianco F, Coppola P, Mazzoli A, Cigliano L, Liverini G, et al. Increased skeletal
384 muscle mitochondrial efficiency in rats with fructose-induced alteration in glucose tolerance. *Br*
385 *J Nutr*. 2013 Dec 14;110(11):1996–2003.
- 386 20. Hokayem M, Blond E, Vidal H, Lambert K, Meugnier E, Feillet-Coudray C, et al. Grape
387 polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree
388 relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2013 Jun;36(6):1454–61.
- 389 21. Couchepin C, Lê K-A, Bortolotti M, da Encarnação JA, Oboni J-B, Tran C, et al. Markedly
390 blunted metabolic effects of fructose in healthy young female subjects compared with male
391 subjects. *Diabetes Care*. 2008 Jun;31(6):1254–6.
- 392 22. Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and
393 hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic
394 parents. *Ann Intern Med*. 1990 Dec 15;113(12):909–15.
- 395 23. Alligier M, Meugnier E, Debard C, Lambert-Porcheron S, Chanseume E, Sothier M, et al.
396 Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by
397 overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Feb;97(2):E183–92.
- 398 24. Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, Chanseume E, Loizon E, Canto C, et al. Regulation of
399 Energy Metabolism and Mitochondrial Function in Skeletal Muscle during Lipid Overfeeding in
400 Healthy Men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Mar 31;jc20134379.
- 401 25. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the
402 probe level. *Bioinformatics*. 2004 Feb 12;20(3):307–15.
- 403 26. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in
404 microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:Article3.
- 405 27. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the
406 comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37(1):1–13.
- 407 28. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Kazi F, Wright G, Donaldson SL, et al. GeneMANIA
408 Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics*. 2010 Nov
409 15;26(22):2927–8.
- 410 29. Bouzakri K, Roques M, Gual P, Espinosa S, Guebre-Egziabher F, Riou J-P, et al. Reduced
411 activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin
412 receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2
413 diabetes. *Diabetes*. 2003 Jun;52(6):1319–25.
- 414 30. Cozzone D, Debard C, Dif N, Ricard N, Disse E, Vouillarmet J, et al. Activation of liver X
415 receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

- 416 cells. *Diabetologia*. 2006 May;49(5):990–9.
- 417 31. Lê K-A, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, et al. A 4-wk high-fructose diet alters
418 lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am J*
419 *Clin Nutr*. 2006 Dec;84(6):1374–9.
- 420 32. Rome S, Lecomte V, Meugnier E, Rieusset J, Debard C, Euthine V, et al. Microarray analyses of
421 SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle. *Physiol*
422 *Genomics*. 2008 Aug 15;34(3):327–37.
- 423 33. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL. New insights concerning the role of
424 carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol (Lond)*. 2007 Jun
425 1;581(Pt 2):431–44.
- 426 34. McGarry JD. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system: its broadening role in
427 fuel homeostasis and new insights into its molecular features. *Biochem Soc Trans*. 1995
428 May;23(2):321–4.
- 429 35. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart J-C, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy
430 metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):571–80.
- 431 36. Pearen MA, Muscat GEO. Minireview: Nuclear hormone receptor 4A signaling: implications for
432 metabolic disease. *Mol Endocrinol*. 2010 Oct;24(10):1891–903.
- 433 37. Oita RC, Mazzatti DJ, Lim FL, Powell JR, Merry BJ. Whole-genome microarray analysis
434 identifies up-regulation of Nr4a nuclear receptors in muscle and liver from diet-restricted rats.
435 *Mech Ageing Dev*. 2009 Apr;130(4):240–7.
- 436 38. Tappy L, Randin JP, Felber JP, Chioloro R, Simonson DC, Jequier E, et al. Comparison of
437 thermogenic effect of fructose and glucose in normal humans. *Am J Physiol*. 1986 Jun;250(6 Pt
438 1):E718–24.
- 439 39. Shinozaki K, Kashiwagi A, Masada M, Okamura T. Stress and vascular responses: oxidative
440 stress and endothelial dysfunction in the insulin-resistant state. *J Pharmacol Sci*. 2003
441 Mar;91(3):187–91.
- 442
- 443

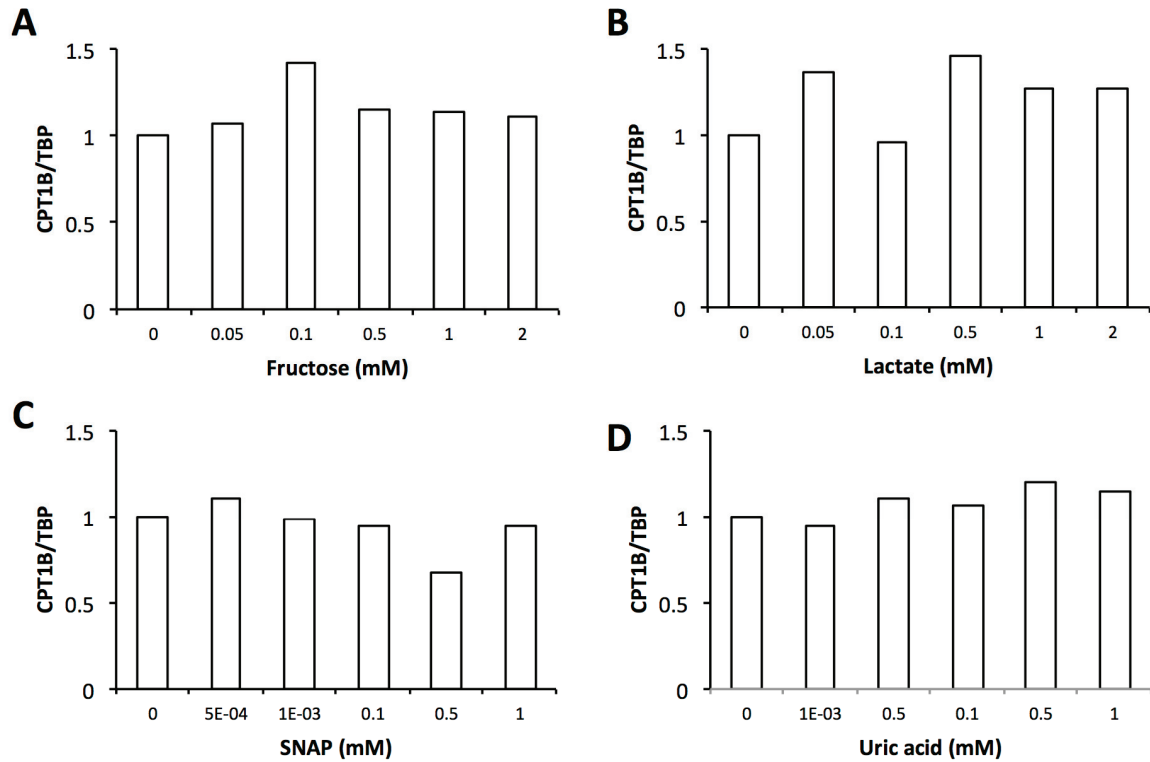
444 FIGURES



445

446 **Figure 1:** Pathway enrichments in the microarray data set using DAVID method. Panel A shows the
 447 most enriched pathways with adjusted P value < 0.0025 (Benjamini), when taken into account the
 448 whole set of regulated genes during HFrD (407 distinct annotated genes). Panel B represents the most
 449 enriched pathways corresponding to the set of down-regulated genes (230 genes, P value < 0.0025).
 450 The black bars identify the pathways related to lipid metabolism, the grey bars represent extracellular
 451 matrix and the shaded black bars the pathways related to mitochondria and mitochondrial function.

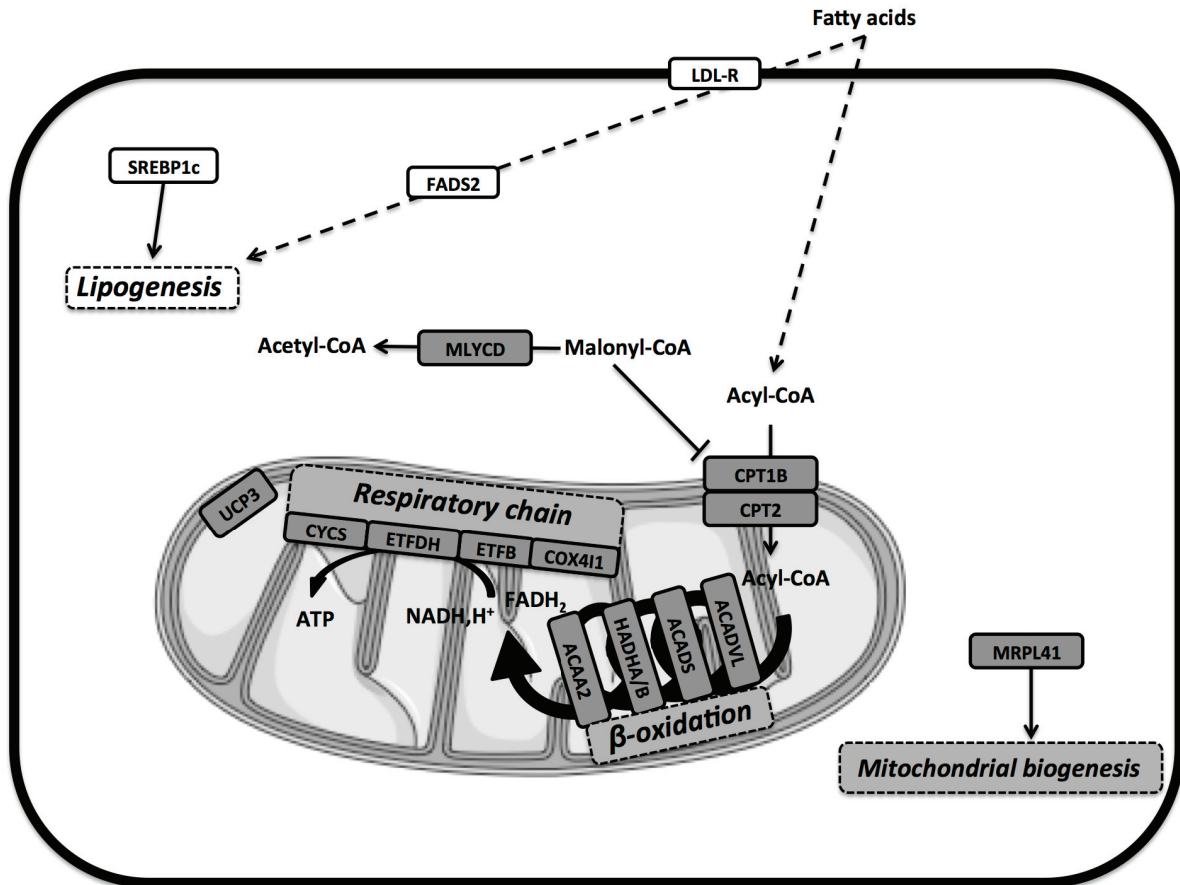
452



453

454 **Figure 2:** Effects of fructose, lactate, uric acid and SNAP on key gene of fatty acid oxidation in
 455 primary human myotubes. Human myotubes derived from healthy donors were cultured and
 456 differentiated in vitro as described in material and methods. Cells were incubated for 24 hours with the
 457 different metabolites at the indicated concentrations. After incubation, total RNA were extracted and
 458 the mRNA levels of specific genes related to fatty acid oxidation were quantified by RT-qPCR. The
 459 figure presents the data for CPT1B mRNA taken the control condition as one.

460



461

462 **Figure 3:** Schematic representation of the main lipid metabolism and mitochondrial pathways affected
 463 in skeletal muscle after 7 days of high-fructose diet. Genes indicated in white boxes were up-regulated
 464 by the HFrD, whereas genes indicated in grey boxes were down-regulated. The gene names are
 465 indicated in Supplementary Table 1.

466

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

467 TABLES

468 **Table 1:** Anthropometric and metabolic parameters of the volunteers after the control diet and after
469 the HFrD.

| | After control diet | After HFrD | <i>P</i> values |
|---|--------------------|-------------|-----------------|
| <i>n</i> | 10 | 10 | |
| Age (years) | 24 ± 1 | 24 ± 1 | |
| Anthropometric parameters | | | |
| Body weight (kg) | 75.1 ± 1.6 | 76.1 ± 1.7 | 0.005 |
| Weight gain (kg) | | 1.01 ± 0.27 | |
| Body mass index (kg/m ²) | 23.3 ± 0.7 | 23.6 ± 0.7 | 0.007 |
| Body fat (%) | 17.6 ± 1.3 | 17.8 ± 1.1 | 0.46 |
| Intrahepatocellular lipids content | 9.1 ± 1.8 | 15.9 ± 3.0 | 0.001 |
| Intramyocellular lipids content | 2.0 ± 0.2 | 2.5 ± 0.3 | 0.05 |
| Metabolic parameters | | | |
| Fasting glucose (mmol/L) | 4.9 ± 0.1 | 5.3 ± 0.1 | 0.005 |
| Fasting insulin (mIU/L) | 8.1 ± 0.5 | 9.8 ± 0.4 | 0.012 |
| Fasting ALAT (IU/L) | 16.9 ± 2.3 | 24.9 ± 4.5 | 0.015 |
| Fasting NEFA (μmol/L) | 591 ± 56 | 374 ± 39 | 0.006 |
| Fasting triacylglycerol (mmol/L) | 0.79 ± 0.1 | 1.39 ± 0.1 | 0.0001 |
| Fasting cholesterol (mmol/L) | 3.8 ± 0.2 | 4.0 ± 0.2 | 0.53 |
| Fasting LDL Cholesterol (mmol/L) | 2.5 ± 0.2 | 2.4 ± 0.2 | 0.97 |
| Fasting HDL Cholesterol (mmol/L) | 1.0 ± 0.07 | 1.0 ± 0.08 | 0.39 |
| Lactate (mmol/L) | 0.84 ± 0.04 | 1.22 ± 0.09 | 0.0004 |
| Uric acid (μmol/L) | 331 ± 15 | 356 ± 22 | 0.037 |
| Calorimetric variables | | | |
| Carbohydrate oxidation (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹) | 1.37 ± 0.07 | 1.95 ± 0.10 | 0.002 |
| Lipid oxidation (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹) | 0.64 ± 0.07 | 0.44 ± 0.05 | 0.003 |
| Hepatic insulin sensitivity | | | |
| Basal endogenous glucose production (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹) | 2.08 ± 0.07 | 2.16 ± 0.07 | 0.25 |
| Hepatic insulin sensitivity index | 6.19 ± 0.40 | 4.84 ± 0.21 | 0.019 |
| Whole body insulin sensitivity | | | |
| Glucose infusion rate (mg.kg ⁻¹ .min ⁻¹) | 6.28 ± 0.36 | 5.99 ± 0.41 | 0.49 |

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

470 **Table 2:** Validation of microarray results by RT-qPCR in skeletal muscle biopsies.

| Gene name | Gene symbol | Microarray data | | RT-qPCR validation | |
|---|-------------|-----------------|----------|--------------------|----------|
| | | Fold change | P values | Fold change | P values |
| Lipid metabolism | | | | | |
| Fatty acid binding protein 3 | FABP3 | 0.76 ± 0.07 | 0.004 | 0.71 ± 0.08 | 0.008 |
| Uncoupling protein 3 | UCP3 | 0.73 ± 0.07 | 0.0005 | 0.55 ± 0.05 | 0.0007 |
| Carnitine palmitoyltransferase 1 (muscle isoform) | CPT1B | 0.74 ± 0.05 | 0.0004 | 0.75 ± 0.07 | 0.015 |
| Malonyl-CoA decarboxylase | MLYCD | 0.61 ± 0.04 | 0.0001 | 0.57 ± 0.04 | 0.0002 |
| Metabolic regulators | | | | | |
| PPARGgamma Coactivator 1 alpha | PGC-1α | 1.03 ± 0.07 | 0.78 | 0.95 ± 0.13 | 0.94 |
| Sterol regulatory element binding protein-1 c | SREBP1c | 1.37 ± 0.11 | 0.0012 | 1.67 ± 0.12 | 0.0005 |
| Peroxisome proliferator-activated receptor alpha | PPARα | 1.01 ± 0.06 | 0.91 | 1.02 ± 0.11 | 0.98 |
| Peroxisome proliferator-activated receptor beta | PPARβ | 1.00 ± 0.04 | 0.94 | 1.01 ± 0.09 | 0.76 |
| Extracellular matrix | | | | | |
| Fibronectin 1 | FN1 | 1.53 ± 0.16 | 0.0011 | 1.61 ± 0.19 | 0.012 |

471

2.3 Discussion

Nous avons démontré que la surnutrition en fructose de 7 jours induit chez nos sujets, une prise de poids moyenne de +1.0 kg, associée à une augmentation du pourcentage de lipides dans le foie et le muscle squelettique bien que le pourcentage de masse grasse, mesuré par la technique des plis cutanés, n'ait pas été modifié. La surnutrition en fructose ne modifie pas la dépense énergétique de repos (données non présentées) mais modifie profondément l'oxydation des glucides et des lipides. En effet, l'oxydation des glucides augmente de +42% tandis que l'oxydation des lipides diminue de -32%. Ces effets sont cohérents avec une réorientation des lipides vers le stockage comme le suggère la baisse de la lipolyse reflétée par la baisse de la concentration en AGL.

De même que pour l'étude n°1, nous avons évalué par la technique de puce à ADN, l'effet de la surnutrition en fructose sur l'expression génique globale du muscle squelettique. Nos données supportent l'orientation de lipides vers le stockage au détriment de leur oxydation au niveau du muscle squelettique. De plus, le fructose a la capacité d'induire une sous-expression de nombreux gènes liés à la mitochondrie, la β -oxydation et la chaîne respiratoire. Nous discuterons, plus en détails, de ces gènes dans le chapitre 5.

Nous avons ensuite cherché à identifier le mécanisme moléculaire sous-jacent nous permettant d'expliquer la baisse de l'oxydation lipidique en s'intéressant, tout particulièrement, aux acteurs clés régulant l'orientation des substrats. Tout comme dans l'étude n°1, nous nous sommes intéressés à l'expression génique des enzymes clés régulant l'oxydation des substrats à savoir la PDH, PDK4 et PDP, et d'un autre côté l'expression de CPT1, ACACA et MLYCD. Bien que les niveaux d'ARNm de la PDH, de PDK4 et de PDP n'aient pas été modifiés par la surnutrition en fructose au sein du muscle squelettique, nous avons identifié une sous-expression coordonnée de CPT1, CPT2 et MLYCD pouvant expliquer la baisse de l'oxydation des lipides et donc l'augmentation de l'oxydation des glucides. La diminution de l'expression de MLYCD peut contribuer à élever les niveaux intracellulaires en malonyl-CoA et induire une inhibition de l'entrée des acides gras dans la mitochondrie par CPT1 (McGarry *et al.* 1977; McGarry 1998). De même la sous-expression de CPT1 et CPT2 peut être la cause d'une baisse de l'oxydation des lipides. Le fructose semble ainsi être capable d'exercer des effets métaboliques sur le muscle squelettique contribuant à inhiber l'oxydation des lipides par le biais de MLYCD, CPT1 et CPT2. De même, la sous-expression

2. L'impact d'une surnutrition en fructose sur le muscle squelettique (étude n°2)

des gènes de la β -oxydation peut renforcer cet effet. Dans une autre étude de surnutrition en fructose, de plus longue durée, mais apportant une quantité moins importante de fructose (1.5 g de fructose par kg de poids par jour), Lê *et al.* n'ont pas démontré de modification de l'expression de MLYCD et de CPT1, ce qui contraste avec nos résultats. Néanmoins, ils ont mis en évidence une sur-expression de SCD1 suggérant une orientation des lipides vers le stockage (Lê *et al.* 2008). De même, ils ont montré une tendance à la sous-expression de PGC1 α , fournissant un mécanisme d'action possible des effets du fructose (Lê *et al.* 2008). En accord avec une autre étude réalisée par notre équipe, étudiant l'effet du même type de surnutrition en fructose sur l'expression génique du muscle squelettique, nous avons mis en évidence une sous-expression de CPT1 et de PGC1 α (Hokayem *et al.* 2013). De même, l'analyse bioinformatique des puces à ADN révèle une sous-expression globale des gènes liés à la mitochondrie incluant des gènes de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative. Il est intéressant de noter, dans cette étude, que la prise de polyphénols extraits de peaux de raisins contrecarre les effets du fructose.

Par la suite, nous avons cherché à identifier par quel biais le fructose est capable d'induire des modifications de l'expression génique du muscle squelettique en réalisant des expériences *in vitro* sur des myotubes humains avec différents composés comme le fructose, l'acide urique, le lactate et le SNAP et en mesurant l'expression du gène clé que nous avons retrouvé *in vivo* (CPT1). Bien qu'une charge en fructose n'élève que de quelques $\mu\text{mol/L}$ la concentration sanguine en fructose, nous avons tout d'abord testé si le fructose exerce un effet direct. L'incubation des myotubes pendant 24h avec différentes concentrations en fructose ne modifie pas l'expression de CPT1, suggérant donc que le fructose médie son action de manière indirecte. Le fructose est bien connu pour induire une augmentation des concentrations sanguines en acide urique et en lactate (Tappy and Lê 2010) tout comme nous l'avons retrouvé dans cette étude. Nous avons donc testé différentes concentrations en lactate, acide urique et SNAP (donneur de NO) mais aucune des ces conditions n'a modifié l'expression de CPT1. D'autres études sont nécessaires pour mettre en évidence le mécanisme d'action du fructose sur le muscle squelettique.

3. L'étude de surnutrition hyperlipidique hyperglucidique (étude n°3)

3.1 Introduction

Comme nous l'avons vu au cours de ce manuscrit, il est nécessaire de bien comprendre quelles sont les conséquences d'une balance énergétique positive sur l'organisme et d'identifier comment un excès calorique contribue à induire des effets métaboliques délétères. Les études de surnutrition nous offrent ainsi la possibilité d'étudier, à plus ou moins long terme, les mécanismes impliqués et de tester si certains traitements peuvent être intéressants afin de lutter contre les effets métaboliques délétères de l'obésité (comme l'insulino-résistance).

Les polyphénols, anciennement connus sous le terme de tanins, sont des molécules antioxydantes présentes à l'état naturel dans notre alimentation et semblent être des micronutriments d'un grand intérêt thérapeutique puisqu'ils pourraient lutter contre les mécanismes inducteurs de l'insulino-résistance aussi bien chez l'animal (Lagouge *et al.* 2006; Anhê *et al.* 2015) que chez l'Homme (Chiva-Blanch *et al.* 2013; Hokayem *et al.* 2013). Les représentants les plus connus de cette famille sont le resvératrol, les anthocyanes et les flavonoïdes. Certains aliments, comme le raisin ou encore l'aubergine, en contiennent naturellement une grande quantité ($\approx 800\text{mg}$ pour 100g d'aubergine ou de raisin noir (Manach *et al.* 2005)).

Chez la souris, Lagouge *et al.* ont démontré qu'une supplémentation en resvératrol lutte contre la prise de poids, la prise de masse grasse et l'insulino-résistance induite par un régime riche en graisse (Lagouge *et al.* 2006). Les auteurs ont identifié que le resvératrol stimule la voie SIRT1/PGC1 α et augmente l'expression de NRF1 et TFAM contribuant ainsi à une biogenèse mitochondriale accrue au niveau du muscle squelettique. Même si les doses utilisées dans cette étude ($400\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) ne peuvent pas être transposées à l'Homme, cette publication met en avant les effets protecteurs d'une molécule naturelle de la famille des polyphénols. Dans une autre étude, Anhê *et al.* ont mis en évidence chez la souris, qu'une supplémentation en polyphénols (extrait de canneberge, $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) permet de lutter contre la prise de poids, l'accumulation de tissu adipeux viscéral et l'insulino-résistance induite par un régime riche en lipides et en glucides simples (Anhê *et al.* 2015). Les auteurs

3. L'étude de surnutrition hyperlipidique hyperglucidique (étude n°3)

ont montré que la supplémentation en polyphénols de canneberge contribue aussi à modifier la flore intestinale des souris en augmentant la proportion de bactéries *Akkermansia*. Cet impact sur la flore intestinale est, bien entendu, à considérer comme un facteur pouvant lutter contre les effets métaboliques délétères de la surnutrition (Cani *et al.* 2007, 2012).

Chez l'Homme, de nombreuses études ont mis en avant des effets positifs de la consommation de polyphénols sur la fonction vasculaire et la tension artérielle (Lockyer *et al.* 2015; Medina-Remón *et al.* 2015), l'inflammation (Macedo *et al.* 2015; Vitaglione *et al.* 2015), la fonction hépatique (Faghihzadeh *et al.* 2014), la sensibilité à l'insuline (Timmers *et al.* 2011) et les lipides sanguins (Timmers *et al.* 2011; Tomé-Carneiro *et al.* 2012). En revanche, très peu d'études chez l'Homme ont considéré ces effets positifs en condition de balance énergétique positive. En effet, la majorité de ces études ont supplémenté des individus obèses, diabétiques ou en surpoids afin d'étudier si une supplémentation en polyphénols permet d'améliorer les paramètres métaboliques de ces sujets déjà pathologiques. Néanmoins, pour réellement mettre en évidence un effet positif d'une supplémentation, il faut challenger l'organisme pour mettre en évidence des différences entre le groupe supplémenté et le groupe placebo. Dans une précédente étude (Hokayem *et al.* 2013), nous avons démontré qu'une supplémentation en polyphénols extraits de raisins (2 g/j) est capable de contrecarrer les effets délétères d'une surnutrition riche en fructose. La supplémentation en polyphénols permet de contrecarrer les effets du fructose sur l'expression génique du muscle squelettique chez des sujets apparentés diabétiques de type 2.

Nous avons entrepris de réaliser une nouvelle étude de surnutrition hyperlipidique hyperglucidique afin de tester si une supplémentation en polyphénols pourrait contrecarrer les effets délétères induits par une surnutrition de plus longue durée. Nous souhaitons donc, par cette nouvelle étude, démontrer que les polyphénols ont un intérêt thérapeutique dans la prévention des complications de l'obésité et notamment dans la prévention de l'insulino-résistance. Nous soumettons actuellement des hommes volontaires sains à 31 jours de surnutrition. Au cours de cette surnutrition, les sujets reçoivent, soit des polyphénols, soit un placebo. Nous évaluons tous nos paramètres d'intérêts en période basale et à la suite de la surnutrition.

3.2 Analyses et résultats

Nous ne détaillerons pas ici les effets des polyphénols en lien avec la surnutrition car cette étude est réalisée en double aveugle, nous ne savons donc pas quels sont les sujets recevant les polyphénols ou le placebo. C'est pourquoi, aucune analyse statistique n'a encore été réalisée pour déterminer si la supplémentation en polyphénols protège contre les effets délétères induits par la surnutrition. Néanmoins, il est intéressant de présenter quelques résultats novateurs en terme de méthodologie et notamment la partie développée avec l'équipe du Dr. Olivier Beuf sur la spectrométrie et l'imagerie par résonance magnétique.

3.2.1 Validation de la segmentation automatique

Tout d'abord, nous avons souhaité valider la méthode de segmentation automatique en comparant celle-ci à une segmentation manuelle.

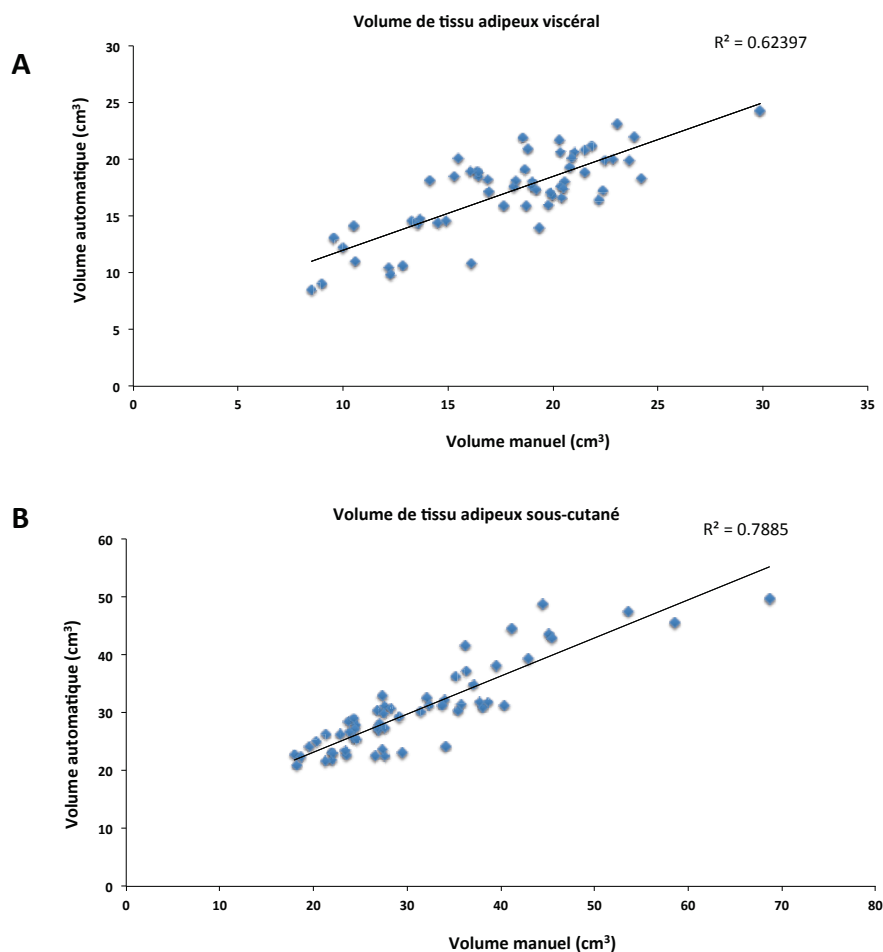


Figure 36: Résultats de corrélation entre la méthode automatique et manuelle en fonction du tissu adipeux considéré (A : viscéral et B : sous-cutané)

3. L'étude de surnutrition hyperlipidique hyperglucidique (étude n°3)

Cette comparaison préliminaire a été réalisée à partir de 59 clichés obtenus à partir de 4 examens. Bien entendu, cette comparaison devra, à l'avenir, être réalisée sur un plus grand nombre de clichés et par au moins deux expérimentateurs afin de prouver la robustesse de la méthode automatique.

Des analyses de corrélation ont été réalisées entre ces deux méthodes pour chaque volume de tissu adipeux, à savoir le volume de tissu adipeux viscéral et le volume de tissu adipeux sous-cutané. Comme illustré dans la figure 36, les coefficients de corrélation entre ces deux méthodes sont, $R^2=0.62$ et $R^2=0.79$ pour les volumes de tissu adipeux viscéral et sous-cutané respectivement.

De plus, la similarité des zones obtenues en fonction des deux méthodes a été analysée en calculant les coefficients DICE (Tang *et al.* 2011). Plus le coefficient est proche de 1, plus la similarité entre les deux zones est importante et, à l'inverse, plus le coefficient est proche de 0, moins il existe de similarité. Comme illustré dans la table 7, les moyennes des coefficients DICE sont de 0.86 ± 0.01 et de 0.79 ± 0.01 pour le tissu adipeux viscéral et le tissu adipeux sous-cutané respectivement.

Table 7 : Coefficients DICE entre la méthode de segmentation manuelle et automatique

| | Moyenne | SEM |
|--|---------|--------|
| Volume de tissu adipeux viscéral | 0.858 | ± 0.01 |
| Volume de tissu adipeux sous-cutané | 0.789 | ± 0.01 |

Ces résultats préliminaires démontrent que la méthode de segmentation automatique est robuste et permet ainsi de traiter les clichés obtenus par imagerie avec cette méthode.

3.2.2 Exemple d'une quantification des volumes de tissu adipeux sous-cutané et viscéral

Comme illustré dans la figure 37, la réalisation de plusieurs coupes d'IRM entre les lombaires L2 et L4 nous permet de suivre l'évolution des volumes de tissu adipeux sous-cutané et viscéral et ainsi d'évaluer spécifiquement en 3D où le tissu adipeux s'accumule. Cet exemple est tiré des deux examens IRM d'un même sujet, avec l'IRM1 représentant les volumes avant surnutrition et l'IRM 2 représentant les volumes après surnutrition. D'une manière globale, on remarque ainsi que la surnutrition induit une augmentation des

3. L'étude de surnutrition hyperlipidique hyperglucidique (étude n°3)

volumes de tissu adipeux. Néanmoins, il est intéressant de remarquer que le tissu adipeux sous-cutané se développe de manière uniforme entre toutes les lombaires avec un gradient croissant de haut en bas, tandis que le tissu adipeux viscéral semble s'accumuler majoritairement au niveau de la lombaire L3. Ce type de résultats est très novateur. Cette méthode a deux atouts majeurs. Le premier est que la quantification est beaucoup plus juste qu'avec une seule coupe et qu'il est ainsi possible de réaliser l'examen avant ou après manger, sans risquer de perturber les résultats à cause du bol alimentaire transitant dans les intestins pouvant décaler le tissu adipeux viscéral. Le deuxième atout de cette méthode est que nous pouvons suivre où le tissu adipeux s'accumule en terme anatomique et ne plus se cantonner à une seule zone.

3. L'étude de surnutrition hyperlipidique hyperglucidique (étude n°3)

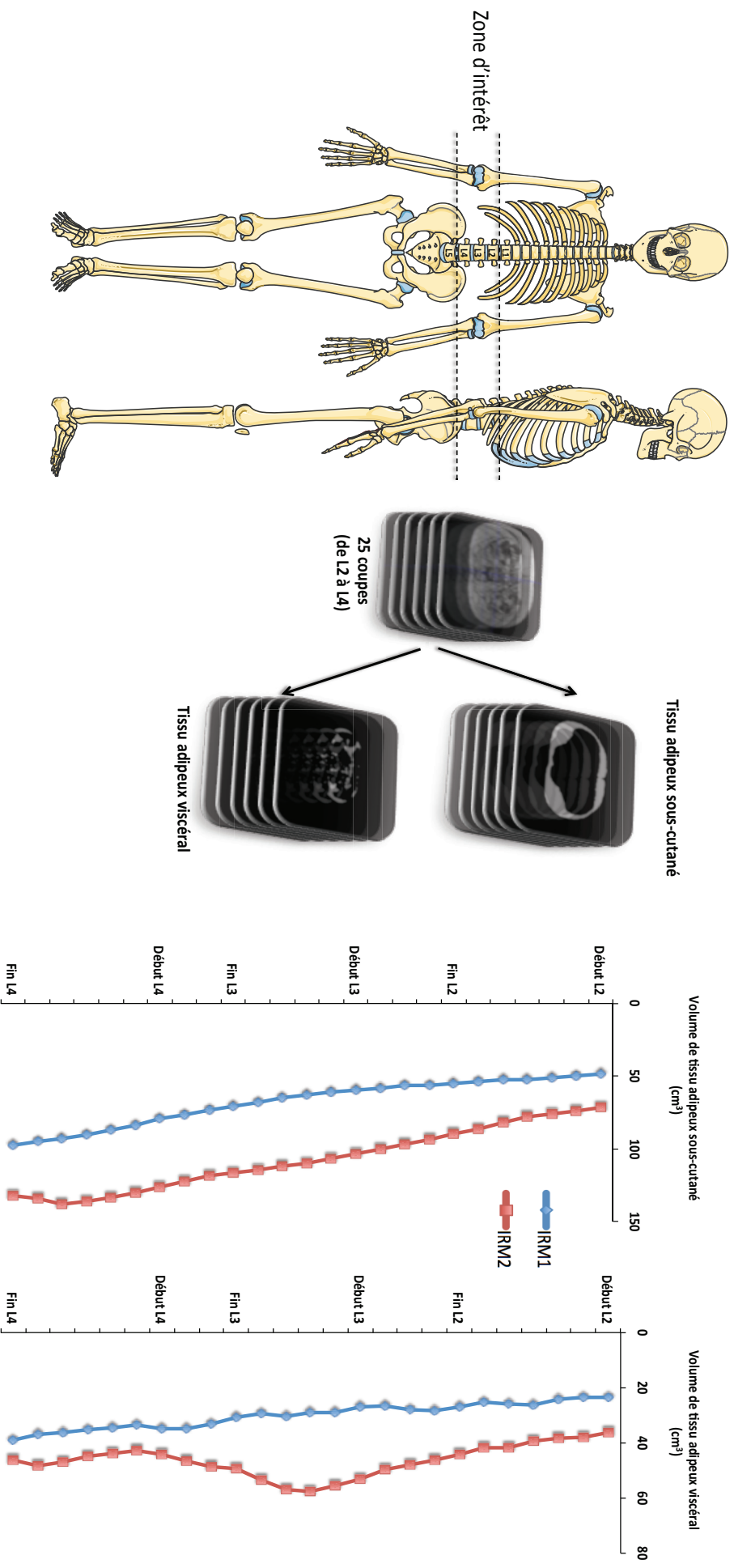


Figure 37 : Exemple de l'évolution du volume de tissu adipeux sous-cutané et viscéral en fonction de la zone considérée (de L2 à L4)

3.2.1 Exemple d'une évaluation de l'index de saturation et d'insaturation du tissu adipeux sous-cutané

Dans ce protocole, nous avons aussi souhaité connaître l'évolution qualitative des lipides composant les dépôts de tissu adipeux. En collaboration avec l'équipe du Dr. Olivier Beuf, nous avons donc mis en place des mesures de spectrométrie par résonance magnétique. La figure 38 illustre le spectre du tissu adipeux sous-cutané d'un sujet.

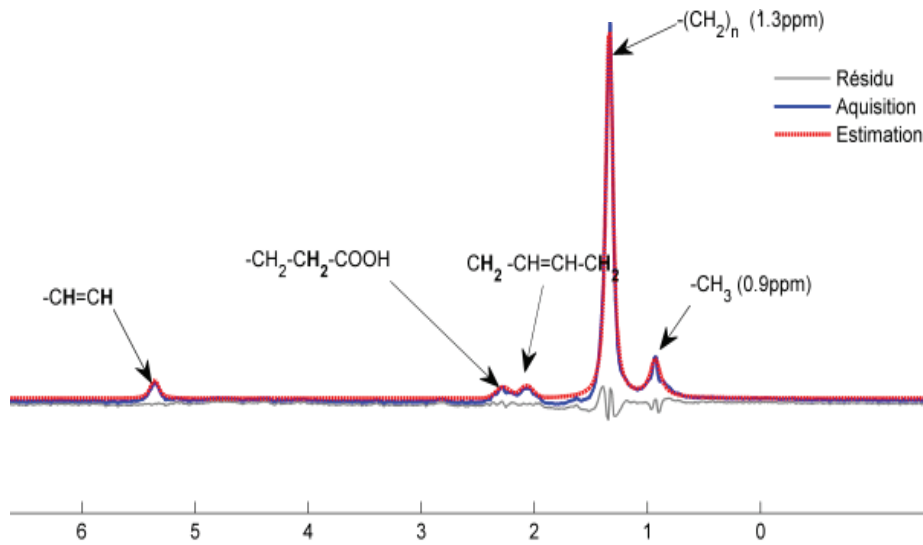


Figure 38 : Exemple d'un spectre obtenu à partir du tissu adipeux sous-cutané.

Ce type de résultat est obtenu à partir d'un voxel placé dans le tissu adipeux. Un voxel est un petit volume de 8mm^3 à l'intérieur duquel le spectre est obtenu. Comme illustré dans la figure 38, chaque groupement chimique H d'une molécule de triglycéride correspond à une raie de résonance dans le spectre. Le rapport de leurs contributions renseigne sur l'insaturation et la saturation des chaînes carbonées (Hamilton *et al.* 2011). L'indice de saturation est calculé à partir du rapport des contributions du groupement méthylène (1.3ppm) sur celles du groupement méthyle (0.9ppm).

Ce type de résultats n'a encore jamais été obtenu à la suite d'une étude de surnutrition. La capacité de cette technique à évaluer de manière non-invasive la qualité des lipides du tissu adipeux est très novatrice. Cette technique peut, dans une certaine mesure, s'appliquer à d'autres zones comme le foie, le muscle et le pancréas, mais la qualité du signal dépendra de la quantité de graisse de la zone étudiée. Il existe ainsi un seuil minimal au delà duquel le signal ne permettra pas d'obtenir des résultats fiables.

Chapitre 5 : Discussion et perspectives

De nos jours, la sédentarité et la surconsommation alimentaire sont deux comportements qui sont renforcés par l'évolution de nos modes de vies. L'épidémie d'obésité à laquelle nous faisons face aujourd'hui en est la manifestation. Dans l'histoire de l'Homme, l'avènement des machines a profondément modifié les dépenses d'énergie liées à l'activité physique et, dans le même temps, l'alimentation a énormément évolué en offre, en qualité et en quantité grâce à l'industrie agro-alimentaire. L'obésité et la prise de poids sont la résultante d'une balance énergétique positive qui peut être favorisée par une alimentation riche en lipides (Lissner et al. 1987) ou encore par la consommation de sodas (DiMeglio and Mattes 2000). De même, la sédentarité est un comportement qui favorise une balance énergétique positive. Dans cette situation, l'organisme doit donc faire face à un excès calorique constant dont nous avons vu les conséquences sur le muscle squelettique. Le muscle squelettique contribue à hauteur de 20 à 30% de la dépense énergétique de repos et c'est le seul organe que nous pouvons solliciter de manière volontaire de façon à augmenter notre dépense énergétique par la pratique d'une activité physique.

1. La surnutrition hyperlipidique vs. la surnutrition en fructose

Il est intéressant de comparer les effets de la surnutrition riche en lipides (étude n°1) et les effets de la surnutrition riche en fructose (étude n°2) sur les paramètres anthropométriques et métaboliques à jeun. Il est bien entendu à noter que ces deux protocoles diffèrent en durée (56 jours vs. 7 jours), en qualité (lipides vs. fructose) et en population étudiée (sujets sains vs. sujets sains apparentés diabétiques de type 2). Les sujets apparentés diabétiques de type 2 sont, bien entendu, plus à risque de devenir diabétique de par leur patrimoine génétique (Warram et al. 1990). Néanmoins ces deux études ont toutes deux évalué l'effet d'un excès calorique d'environ +30% des apports énergétiques journaliers.

1.1 Comparaison des effets sur les paramètres anthropométriques

Ces deux études de surnutrition ont abouti à une prise de poids significative des sujets. La durée de chaque étude est à considérer pour expliquer la différence de prise de poids. Il est intéressant de noter que dans ces deux études l'excès calorique a induit un stockage ectopique de lipides au niveau hépatique et musculaire. Ce phénomène semble donc être une conséquence commune à un excès calorique.

1.2 Comparaison des effets sur les paramètres métaboliques

L'oxydation des substrats est profondément modifiée dans ces deux études, avec une oxydation préférentielle des glucides au détriment des lipides. Néanmoins il semble que le fructose module, de manière plus importante, la balance oxydative des substrats à jeun puisqu'on retrouve une diminution de -32% de l'oxydation lipidique tandis que la surnutrition en lipides induit une baisse de l'oxydation lipidique de -14% à J14 et -11% à J56. Il ne semble pas que cette différence soit due à la population étudiée dans l'étude n°2 (sujets apparentés diabétiques de type 2) puisqu'on retrouve une baisse similaire de l'ordre de -30% chez des sujets sains ayant été soumis à 7 jours de surnutrition riche en fructose (Lê *et al.* 2009; Ngo Sock *et al.* 2010). De même la surnutrition en fructose diminue de façon plus importante la concentration sanguine en acides gras libres à jeun comparativement à la surnutrition en lipides (36% vs. 25% à J14 et 17% à J56 respectivement). Un dernier point concerne l'évolution de la triglycéridémie à jeun à la suite de ces deux surnutritions. En effet, alors même que la surnutrition en fructose contribue fortement à augmenter la concentration sanguine en triglycérides, la surnutrition en lipides ne modifie pas celle-ci. Cet effet témoigne de l'impact qu'a le fructose sur la fonction hépatique.

1.3 Comparaison de l'expression génique du muscle squelettique

Dans l'étude n°1 et n°2 nous avons évalué l'effet de l'excès calorique sur l'expression génique du muscle squelettique à l'aide de puce à ADN Affymetrix afin d'identifier les grandes voies métaboliques régulées. Nous avons ainsi identifié au niveau moléculaire des cibles nous permettant d'expliquer la modulation de l'oxydation des substrats. Dans l'étude

n°1, nous avons mis en évidence que la surnutrition hyperlipidique régule l'expression de 673 gènes dont 459 sont sur-exprimés et 214 sont sous-exprimés. A l'aide d'outils de bioinformatique, nous avons mis en évidence un enrichissement significatif des fonctions liées au métabolisme des lipides (« fatty acid metabolic process » et « carboxylic acid metabolic process »), au processus d'oxydo-réduction (« oxidoreductase » et « oxidation reduction »), à la mitochondrie (« mitochondrion » et « mitochondrial part ») et à l'acétylation (« acetylation »). De façon intéressante, la surnutrition hyperlipidique a contribué à sur-exprimer de nombreux gènes liés au métabolisme des lipides pouvant expliquer l'augmentation des lipides intracellulaires au niveau du muscle squelettique (données non présentées). Nous avons mis en évidence une sur-expression coordonnée de gènes liés :

- **au transport des lipides** (low density lipoprotein receptor (LDLR), apolipoprotein O (APOO), apolipoprotein A1 binding protein (APOA1BP), et fatty acid binding protein 3 (FABP3)),
- **à la lipogénèse** (acetyl-CoA carboxylase- α (ACACA), acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (ACSS2), fatty acid desaturase 1 (FADS1) et stearoyl-CoA desaturase (SCD)),
- **à la synthèse de triglycérides et la gouttelette lipidique** (diacylglycerol O-acyltransferase 2 (DGAT2), perilipin (PLIN2) et patatin-like phospholipase domain containing 4 (PNPLA4)).

La surnutrition hyperlipidique contribue ainsi au niveau musculaire à réorienter les lipides vers le stockage. La sur-expression d'ACACA et la sous-expression de PDK4 favorisent aussi ce phénomène de stockage des lipides en inhibant l'oxydation de lipides et en favorisant l'oxydation des glucides. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction l'ACACA catalyse la formation de malonyl-CoA à partir d'acétyl-CoA. Le malonyl-CoA est un puissant inhibiteur de CPT1 qui régule l'entrée des acides à longue chaîne dans la mitochondrie (McGarry les deux). Ainsi, si l'augmentation de l'ARNm d'ACACA se concrétise par une augmentation de ses niveaux en protéines alors cette régulation pourrait expliquer la baisse de l'oxydation lipidique. De même, la baisse des niveaux en ARNm de PDK4 que nous avons retrouvée devrait conduire à moins forte inhibition de la PDH favorisant ainsi l'oxydation des glucides (Holness and Sugden 2003). L'expression de PDK4 est sous la dépendance de

l'activation de PGC1 α qui peut interagir avec de nombreux facteurs de transcription comme PPAR α , FOXO1 et ERR α qui sont tous des activateurs de la transcription de PDK4 (Pilegaard and Neuffer 2004; Wende *et al.* 2005). Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, SIRT1 est un des régulateurs majeurs de l'activité de PGC1 α sous la dépendance des niveaux en NAD⁺ (Cantó and Auwerx 2012). Nous avons mis en évidence que la surnutrition induit une baisse du contenu intracellulaire en NAD⁺ au niveau du muscle squelettique entraînant ainsi une moins forte activité de SIRT1. L'hyperacétylation de PGC1 α retrouvée supporte ainsi cette hypothèse. Ce phénomène d'inactivation de la voie SIRT1/PGC1 α fournit alors une explication potentielle à la baisse de l'expression de PDK4 et semble être l'image miroir de ce que nous retrouvons en condition de restriction calorique. Néanmoins l'inactivation de cette voie aurait aussi dû contribuer à une diminution de la biogénèse mitochondriale. Or, nous avons mis en évidence que 87% des gènes liés à la mitochondrie sont sur-exprimés. En effet, nous avons retrouvé une sur-expression de nombreux gènes liés :

- **au complexe I** (nicotinamide adenine dinucleotide hydroxide dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1 (NDUFS1),
- **au complexe II** (electron transferring flavoprotein dehydrogenase (ETFDH),
- **au complexe III** [ubiquinol cytochrome c reductase, complex III subunit X (UQCRC1), coenzyme Q6 monooxygenase (COQ6))
- **au complexe V** (ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor (ATPAF1 et ATPAF2)

De même nous avons mis en évidence une sur-expression de gènes impliqués dans la régulation de la transcription du génome mitochondrial comme DNA directed- γ (POLG) et six différentes protéines ribosomales (mitochondrial ribosomal protein-L12, -L19, -S5, -S17, -S22, and -S25). Afin de nous assurer que la surnutrition est bien associée à une biogénèse mitochondriale nous avons mesuré dans nos échantillons musculaires la quantité relative d'ADN mitochondriale et nous avons mis en évidence une augmentation du ratio cytochrome C oxidase subunit I (COX1, génome mitochondrial) sur peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A, génome nucléaire) témoignant d'une augmentation de la biogénèse mitochondriale.

Ces résultats obtenus avec la surnutrition hyperlipidique contrastent en partie avec la régulation de l'expression des gènes que nous avons retrouvés avec la surnutrition en

fructose. En effet, dans l'étude n°2 nous avons mis en évidence que la surnutrition en fructose régule l'expression de 407 gènes dont 177 sont sur-exprimés et 230 sont sous-exprimés. En analysant l'ensemble de ces données nous avons montré un enrichissement significatif des fonctions liées au métabolisme et à l'oxydation des lipides (« fatty acid beta-oxidation », « fatty acid catabolic process », « lipid oxidation », « fatty acid oxidation » et « fatty acid metabolism ») et dans une moindre mesure à la matrice extracellulaire (« collagen » et « extracellular matrix part »). Par la suite nous avons réitéré cette analyse de bioinformatique à partir de la liste de gènes sous-exprimés. Nous avons alors trouvé un enrichissement de fonctions liées au métabolisme et à l'oxydation des lipides (« fatty acid beta-oxidation », « fatty acid catabolic process », « fatty acid oxidation » et « fatty acid metabolism ») et à la mitochondrie (« mitochondrial membrane », « mitochondrial enveloppe » et « mitochondrion »). Ces données mettent en avant que la surnutrition en fructose altère l'expression de nombreux gènes liés au métabolisme des lipides, à l'oxydation des acides gras et à la mitochondrie. Même s'il semble qu'il existe une sur-expression commune entre ces deux types de surnutrition permettant le stockage de lipides dans le muscle squelettique (low density lipoprotein receptor (LDLR) and fatty acid desaturase 2 (FADS2)) le fructose contribue à sous-exprimer une pléiade de gènes nécessaire à l'oxydation des lipides. Nous avons ainsi retrouvé une baisse de l'expression de gènes liés à :

- **l'entrée des acides gras à longue dans la mitochondrie** (CPT1B et CPT2),
- **la formation en malonyl-CoA** (MLYCD),
- **la β -oxydation** (acyl-CoA dehydrogenase very long chain (ACADVL), acyl-CoA dehydrogenase C2 to C3 short chain (ACADS), hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase alpha and beta subunit (HADHA and HADHB) et acetyl-CoA acyltransferase 2 (ACAA2))
- **la chaîne respiratoire** (cytochrome c somatic (CYCS), electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide (ETFB), electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase (ETFDH) et cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1(COX4I1)
- **la mitochondrie** (uncoupling protein 3 (UCP3), mitochondrial ribosomal protein L41 (MRPL41).

La surnutrition riche en fructose contribue ainsi à diminuer l'expression de nombreux gènes nécessaires à l'oxydation des lipides nous fournissant une explication potentielle de la baisse de l'oxydation lipidique.

Dans ces deux études, il serait intéressant de mesurer l'expression protéique des gènes clés que nous avons trouvés régulés afin d'avoir une vue globale des effets de chaque surnutrition. De plus, il serait alors intéressant de réaliser une étude en combinant à la fois les lipides et le fructose afin d'étudier, de façon la plus réaliste possible, si ces deux substrats apportés en excès n'auraient pas un effet synergique sur la régulation de l'expression des gènes du muscle squelettique. Ce point pourra notamment être abordé grâce à l'analyse des données de l'étude n°3 qui allie à la fois un apport conséquent de lipides et de glucides dont $\frac{1}{4}$ est du fructose.

2. Les modèles de surnutrition vs. la vie réelle ?

Il est important de savoir si nos modèles de surnutrition miment, de façon réaliste, la surconsommation alimentaire que nous pouvons retrouver dans la population générale. Pour répondre à cette question nous aborderons tout d'abord le phénomène de surconsommation passive induit par les lipides et par les sodas, puis nous discuterons plus largement de l'utilisation des lipides et du fructose par l'industrie agro-alimentaire.

Tout d'abord il est important de rappeler qu'une alimentation enrichie en lipides favorise de manière spontanée une prise alimentaire trop importante (Lissner *et al.* 1987) de même que la consommation de sodas (DiMeglio and Mattes 2000). Ces études mettent en avant le phénomène de surconsommation passive que certains aliments peuvent induire car ils n'entraînent que très peu de satiété. L'excès calorique ingéré par les sujets de ces deux études est de +15.4% (Lissner *et al.* 1987) et +18% (DiMeglio and Mattes 2000) des apports énergétiques journaliers. Nos deux surnutritions (étude n°1 et n°2) apportent ainsi deux fois plus de calories que lors d'une situation de surconsommation passive réelle, autrement dit, nos modèles de surnutrition exagèrent un peu la réalité. Ils miment alors un excès calorique plus important, mais sur une durée très courte, comparativement à l'obésité qui s'installe de façon insidieuse sur plusieurs années. On peut ainsi considérer que les effets que nous retrouvons dans nos études de surnutrition reflètent de manière accélérée ce que nous pouvons retrouver dans la population générale. Il est d'ailleurs intéressant de rappeler qu'en

France 43% des adultes et 34% des enfants ont une part trop importante de lipides dans leur alimentation avec un pourcentage dépassant la fourchette haute des 40% recommandés (ANSES). De même, la base de données d'Euromonitor International qui recense la consommation moyenne de soda à travers le monde, nous indique qu'un américain consomme en moyenne 170 litres de sodas par an, soit 460mL par jour, tandis qu'un français en consomme 45 litres par an soit 123 mL par jour. Ces chiffres sont à mettre aux regards de la prévalence de l'obésité qui est deux fois plus importante aux Etats-Unis (34.9%) qu'en France (15%).

Le fructose, qui est à l'origine le sucre du fruit, est maintenant produit de manière industrielle à partir de différents procédés enzymatiques. Sa fabrication peut être réalisée à partir d'amidon de maïs ou de blé et permet d'obtenir du sirop à haute teneur en fructose, « high-fructose corn syrup » en anglais (HFCS). Il en existe principalement trois types :

- le HFCS 42 qui contient 42% de fructose et 58% de glucose
- le HFCS 55 qui contient 55% de fructose et 45% de glucose
- le HFCS 90 qui contient 90% de fructose et 10% de glucose.

Ces trois solutions, plus ou moins riches en fructose, sont utilisées par l'industrie agro-alimentaire dans de nombreux aliments et boissons à la place du traditionnel saccharose car ils ont le même pouvoir sucrant, un coût de fabrication plus faible et des propriétés physico-chimiques idéales pour la conservation, le transport et le stockage (Hanover and White 1993). Ils apparaissent alors dans la liste des ingrédients sous le nom d'isoglucose, de sirop glucose-fructose ou encore de sirop de fructose-glucose. Le sirop à haute teneur en fructose représente maintenant environ 50% des sucres ajoutés et on le retrouve dans les sodas, les pâtisseries, les fruits en conserve, les confitures, les crèmes glacées et d'autres aliments industriels. Un point à soulever concerne leur utilisation dans les sodas en Europe. En effet, en Europe, la production d'isoglucose contenant plus de 10% de fructose est réglementée par quota, or un sirop ne contenant que 10% de fructose ne suffit pas à obtenir un pouvoir sucrant équivalant au saccharose. C'est pourquoi les sodas en Europe sont fabriqués à partir de saccharose, contrairement à la plupart des autres pays. Ainsi un soda européen est composé de 50% de glucose et 50% de fructose tandis qu'un soda américain est composé en moyenne de plus de 60% de fructose et 40% de glucose, d'après une récente étude (Walker *et al.* 2014).

Hormis les aliments industriels qui peuvent apporter des quantités non négligeables de fructose, on ne retrouve que peu d'aliments naturels apportant autant de fructose dans notre alimentation, seuls les fruits et le miel peuvent concurrencer un tel apport. A titre de comparaison, à quantité équivalente une pomme ou un kiwi apportent autant de fructose qu'un soda. Néanmoins, les fruits apportent aussi à l'organisme des vitamines, des minéraux et des fibres tandis qu'un soda n'apporte que des calories. La consommation importante de produits industriels et de fast-food peut ainsi favoriser la surconsommation de lipides et de fructose car l'industrie agro-alimentaire ajoute, dans de nombreux produits, des graisses et du fructose.

Pour conclure nous pouvons dire que nos modèles de surnutrition reflètent, à court terme, les effets que nous pourrions retrouver, à plus long terme, dans la population générale et plus spécifiquement chez des personnes qui ont une alimentation à base de produits industriels. De nos jours, il apparaît indispensable de retrouver le plaisir de cuisiner des produits frais et naturels comme les fruits et les légumes et d'éviter autant que possible la consommation de produits industriels à haute densité énergétique comme les barres chocolatées ou encore le soda qui n'apportent que des calories.

Références bibliographiques

- Abu-Elheiga, L., Almarza-Ortega, D. B., Baldini, A., & Wakil, S. J. (1997). Human acetyl-CoA carboxylase 2. Molecular cloning, characterization, chromosomal mapping, and evidence for two isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(16), 10669–10677.
- Alam, N., & Saggerson, E. D. (1998). Malonyl-CoA and the regulation of fatty acid oxidation in soleus muscle. *The Biochemical Journal*, 334 (Pt 1), 233–241.
- Alligier, M., Gabert, L., Meugnier, E., Lambert-Porcheron, S., Chanseume, E., Pilleul, F., *et al.* (2013). Visceral fat accumulation during lipid overfeeding is related to subcutaneous adipose tissue characteristics in healthy men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(2), 802–810.
- Alligier, M., Meugnier, E., Debard, C., Lambert-Porcheron, S., Chanseume, E., Sothier, M., *et al.* (2012). Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 97(2), E183–192.
- Allirot, X., Saulais, L., Disse, E., Roth, H., Cazal, C., & Laville, M. (2012). Validation of a buffet meal design in an experimental restaurant. *Appetite*, 58(3), 889–897.
- Allirot, X., Saulais, L., Seyssel, K., Graeppi-Dulac, J., Roth, H., Charrié, A., *et al.* (2013). An isocaloric increase of eating episodes in the morning contributes to decrease energy intake at lunch in lean men. *Physiology & behavior*, 110-111, 169–178.
- Allirot, X., Seyssel, K., Saulais, L., Roth, H., Charrié, A., Draï, J., *et al.* (2014). Effects of a breakfast spread out over time on the food intake at lunch and the hormonal responses in obese men. *Physiology & behavior*, 127C, 37–44.
- Andersen, R. E., Crespo, C. J., Bartlett, S. J., Cheskin, L. J., & Pratt, M. (1998). Relationship of physical activity and television watching with body weight and level of fatness among children: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*, 279(12), 938–942.
- Anhê, F. F., Roy, D., Pilon, G., Dudonné, S., Matamoros, S., Varin, T. V., *et al.* (2015). A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased Akkermansia spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*, 64(6), 872–883.
- An, R. (2015). Fast-food and full-service restaurant consumption and daily energy and nutrient intakes in US adults. *European Journal of Clinical Nutrition*.
- Assy, N., Nasser, G., Kamayse, I., Nseir, W., Beniashvili, Z., Djibre, A., & Grosovski, M. (2008). Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Canadian Journal of Gastroenterology = Journal Canadien De*

- Gastroenterologie*, 22(10), 811–816.
- Astrup, A. (1999). Macronutrient balances and obesity: the role of diet and physical activity. *Public Health Nutrition*, 2(3A), 341–347.
- Azagury, D. E., & Lautz, D. B. (2011). Obesity Overview: Epidemiology, Health and Financial Impact, and Guidelines for Qualification for Surgical Therapy. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, 21(2), 189–201.
- Baker, P. G., & Mottram, R. F. (1973). Metabolism of exercising and resting human skeletal muscle, in the post-prandial and fasting states. *Clinical Science*, 44(5), 479–491.
- Beales, P. L. (2010). Obesity in single gene disorders. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 94, 125–157. doi:10.1016/B978-0-12-375003-7.00005-4
- Bellisle, F. (2014). Meals and snacking, diet quality and energy balance. *Physiology & Behavior*, 134, 38–43.
- Bellisle, F., Dalix, A. M., & Slama, G. (2004). Non food-related environmental stimuli induce increased meal intake in healthy women: comparison of television viewing versus listening to a recorded story in laboratory settings. *Appetite*, 43(2), 175–180.
- Bellissimo, N., Pencharz, P. B., Thomas, S. G., & Anderson, G. H. (2007). Effect of television viewing at mealtime on food intake after a glucose preload in boys. *Pediatric Research*, 61(6), 745–749.
- Berg, C., Lappas, G., Wolk, A., Strandhagen, E., Torén, K., Rosengren, A., et al. (2009). Eating patterns and portion size associated with obesity in a Swedish population. *Appetite*, 52(1), 21–26.
- Bergouignan, A., Trudel, G., Simon, C., Chopard, A., Schoeller, D. A., Momken, I., et al. (2009). Physical inactivity differentially alters dietary oleate and palmitate trafficking. *Diabetes*, 58(2), 367–376.
- Bertéus Forslund, H., Torgerson, J. S., Sjöström, L., & Lindroos, A. K. (2005). Snacking frequency in relation to energy intake and food choices in obese men and women compared to a reference population. *International Journal of Obesity*, 29(6), 711–719.
- Bezaire, V., Bruce, C. R., Heigenhauser, G. J. F., Tandon, N. N., Glatz, J. F. C., Luiken, J. J. J. F., et al. (2006). Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290(3), E509–515.
- Bizeau, M. E., & Pagliassotti, M. J. (2005). Hepatic adaptations to sucrose and fructose. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 54(9), 1189–1201.
- Björntorp, P. (1990). “Portal” adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)*, 10(4), 493–496.
- Blanc, S., Normand, S., Pachiaudi, C., Fortrat, J. O., Laville, M., & Gharib, C. (2000). Fuel

- homeostasis during physical inactivity induced by bed rest. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(6), 2223–2233.
- Blass, E. M., Anderson, D. R., Kirkorian, H. L., Pempek, T. A., Price, I., & Koleini, M. F. (2006). On the road to obesity: Television viewing increases intake of high-density foods. *Physiology & Behavior*, 88(4-5), 597–604.
- Blond, E., Maitrepierre, C., Normand, S., Sothier, M., Roth, H., Goudable, J., & Laville, M. (2011). A new indirect calorimeter is accurate and reliable for measuring basal energy expenditure, thermic effect of food and substrate oxidation in obese and healthy subjects. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 6(1), e7–e15.
- Blüher, M. (2010). The distinction of metabolically “healthy” from “unhealthy” obese individuals. *Current opinion in lipidology*, 21(1), 38–43.
- Blundell, J. E., Burley, V. J., Cotton, J. R., & Lawton, C. L. (1993). Dietary fat and the control of energy intake: evaluating the effects of fat on meal size and postmeal satiety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5 Suppl), 772S–777S; discussion 777S–778S.
- Blundell, J. E., Lawton, C. L., Cotton, J. R., & Macdiarmid, J. I. (1996). Control of human appetite: implications for the intake of dietary fat. *Annual Review of Nutrition*, 16, 285–319.
- Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseaume, E., Chauvin, M.-A., Morio, B., et al. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 789–800.
- Bouchard, C. (1991). Current understanding of the etiology of obesity: genetic and nongenetic factors. *The American journal of clinical nutrition*, 53(6 Suppl), 1561S–1565S.
- Bouchard, C., Tremblay, A., Després, J. P., Nadeau, A., Lupien, P. J., Thériault, G., et al. (1990). The response to long-term overfeeding in identical twins. *The New England journal of medicine*, 322(21), 1477–1482.
- Bowker-Kinley, M. M., Davis, W. I., Wu, P., Harris, R. A., & Popov, K. M. (1998). Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *The Biochemical Journal*, 329 (Pt 1), 191–196.
- Bray, G. A., Nielsen, S. J., & Popkin, B. M. (2004). Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 537–543.
- Bray, G. A., & Popkin, B. M. (1998). Dietary fat intake does affect obesity! *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6), 1157–1173.
- Bray, G., Smith, S. R., de Jonge, L., Xie, H., Rood, J., Martin, C. K., et al. (2012). Effect of dietary protein content on weight gain, energy expenditure, and body composition during overeating: a randomized controlled trial. *JAMA*, 307(1), 47–55.

- Brøns, C., Jensen, C. B., Storgaard, H., Hiscock, N. J., White, A., Appel, J. S., *et al.* (2009). Impact of short-term high-fat feeding on glucose and insulin metabolism in young healthy men. *The Journal of Physiology*, *587*(Pt 10), 2387–2397.
- Brownsey, R. W., Boone, A. N., Elliott, J. E., Kulpa, J. E., & Lee, W. M. (2006). Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, *34*(Pt 2), 223–227.
- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., *et al.* (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, *56*(7), 1761–1772.
- Cani, P. D., Osto, M., Geurts, L., & Everard, A. (2012). Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. *Gut Microbes*, *3*(4), 279–288.
- Cantó, C., & Auwerx, J. (2012). Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD(+)? *Pharmacological reviews*, *64*(1), 166–187.
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., *et al.* (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, *458*(7241), 1056–1060.
- Cantó, C., Jiang, L. Q., Deshmukh, A. S., Matak, C., Coste, A., Lagouge, M., *et al.* (2010). Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metabolism*, *11*(3), 213–219.
- Casas-Agustench, P., López-Uriarte, P., Bulló, M., Ros, E., Gómez-Flores, A., & Salas-Salvadó, J. (2009). Acute effects of three high-fat meals with different fat saturations on energy expenditure, substrate oxidation and satiety. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *28*(1), 39–45.
- Chen, L.-L., Zhang, H.-H., Zheng, J., Hu, X., Kong, W., Hu, D., *et al.* (2011). Resveratrol attenuates high-fat diet-induced insulin resistance by influencing skeletal muscle lipid transport and subsarcolemmal mitochondrial β -oxidation. *Metabolism: clinical and experimental*, *60*(11), 1598–1609.
- Ching, P. L., Willett, W. C., Rimm, E. B., Colditz, G. A., Gortmaker, S. L., & Stampfer, M. J. (1996). Activity level and risk of overweight in male health professionals. *American Journal of Public Health*, *86*(1), 25–30.
- Chiva-Blanch, G., Urpi-Sarda, M., Ros, E., Valderas-Martinez, P., Casas, R., Arranz, S., *et al.* (2013). Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: a randomized clinical trial. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *32*(2), 200–206.
- Choi, H. K., Willett, W. C., Stampfer, M. J., Rimm, E., & Hu, F. B. (2005). Dairy consumption and risk of type 2 diabetes mellitus in men: a prospective study. *Archives of Internal Medicine*, *165*(9), 997–1003.
- Clément, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., *et al.* (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction.

Nature, 392(6674), 398–401. doi:10.1038/32911

- Coakley, E. H., Rimm, E. B., Colditz, G., Kawachi, I., & Willett, W. (1998). Predictors of weight change in men: results from the Health Professionals Follow-up Study. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 22(2), 89–96.
- Colditz, G. A., Willett, W. C., Stampfer, M. J., London, S. J., Segal, M. R., & Speizer, F. E. (1990). Patterns of weight change and their relation to diet in a cohort of healthy women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(6), 1100–1105.
- Couchepin, C., Lê, K.-A., Bortolotti, M., da Encarnação, J. A., Oboni, J.-B., Tran, C., *et al.* (2008). Markedly blunted metabolic effects of fructose in healthy young female subjects compared with male subjects. *Diabetes Care*, 31(6), 1254–1256.
- DeFronzo, R. A., Tobin, J. D., & Andres, R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *The American journal of physiology*, 237(3), E214–223.
- Dériaz, O., Fournier, G., Tremblay, A., Després, J. P., & Bouchard, C. (1992). Lean-body-mass composition and resting energy expenditure before and after long-term overfeeding. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 56(5), 840–847.
- Després, J. P. (2006a). Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for Type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Journal of endocrinological investigation*, 29(3 Suppl), 77–82.
- Després, J.-P. (2006b). Is visceral obesity the cause of the metabolic syndrome? *Annals of Medicine*, 38(1), 52–63.
- Després, J.-P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, 444(7121), 881–887.
- Diaz, E. O., Prentice, A. M., Goldberg, G. R., Murgatroyd, P. R., & Coward, W. A. (1992). Metabolic response to experimental overfeeding in lean and overweight healthy volunteers. *The American journal of clinical nutrition*, 56(4), 641–655.
- Dietz, W. H., & Gortmaker, S. L. (1985). Do we fatten our children at the television set? Obesity and television viewing in children and adolescents. *Pediatrics*, 75(5), 807–812.
- DiMeglio, D. P., & Mattes, R. D. (2000). Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24(6), 794–800.
- Dirlewanger, M., di Vetta, V., Guenat, E., Battilana, P., Seematter, G., Schneiter, P., *et al.* (2000). Effects of short-term carbohydrate or fat overfeeding on energy expenditure and plasma leptin concentrations in healthy female subjects. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for*

- the Study of Obesity*, 24(11), 1413–1418.
- Doege, H., Bocianski, A., Joost, H. G., & Schürmann, A. (2000). Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *The Biochemical Journal*, 350 Pt 3, 771–776.
- Doege, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H. G., & Schürmann, A. (2001). Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *The Biochemical Journal*, 359(Pt 2), 443–449.
- Doege, H., Schürmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A., & Joost, H. G. (2000). GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 16275–16280.
- Dubern, B., & Clement, K. (2012). Leptin and leptin receptor-related monogenic obesity. *Biochimie*, 94(10), 2111–2115.
- Eaton, S., Bartlett, K., & Pourfarzam, M. (1996). Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochemical Journal*, 320(Pt 2), 345–357.
- Egli, L., Lecoultré, V., Theytaz, F., Campos, V., Hodson, L., Schneiter, P., *et al.* (2013). Exercise prevents fructose-induced hypertriglyceridemia in healthy young subjects. *Diabetes*, 62(7), 2259–2265.
- Elia, M. (2000). Hunger disease. *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 19(6), 379–386.
- Fabbrini, E., Yoshino, J., Yoshino, M., Magkos, F., Tiemann Luecking, C., Samovski, D., *et al.* (2015). Metabolically normal obese people are protected from adverse effects following weight gain. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(2), 787–795.
- Fabry, P., Hejl, Z., Fodor, J., Braun, T., & Zvolankova, K. (1964). THE FREQUENCY OF MEALS. ITS RELATION TO OVERWEIGHT, HYPERCHOLESTEROLAEMIA, AND DECREASED GLUCOSE-TOLERANCE. *Lancet (London, England)*, 2(7360), 614–615.
- Faeh, D., Minehira, K., Schwarz, J.-M., Periasamy, R., Periasami, R., Park, S., *et al.* (2005). Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes*, 54(7), 1907–1913.
- Faghihzadeh, F., Adibi, P., Rafiei, R., & Hekmatdoost, A. (2014). Resveratrol supplementation improves inflammatory biomarkers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Nutrition Research (New York, N.Y.)*, 34(10), 837–843.
- Farooqi, I. S., Yeo, G. S., & O’Rahilly, S. (2003). Binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *The New England Journal of Medicine*, 349(6), 606–609; author reply 606–609.
- Fediuc, S., Gaidhu, M. P., & Ceddia, R. B. (2006). Regulation of AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation by palmitate in skeletal muscle cells. *Journal of Lipid Research*, 47(2), 412–420.

- Ferrannini, E. (1988). The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism: clinical and experimental*, 37(3), 287–301.
- Ferrières, J., Bongard, V., Dallongeville, J., Simon, C., Bingham, A., Amouyel, P., *et al.* (2006). Consommation de produits laitiers et facteurs de risque cardiovasculaire dans l'étude Monica. *EM-Consulte*. <http://www.em-consulte.com/article/79150>.
- Finucane, M. M., Stevens, G. A., Cowan, M. J., Danaei, G., Lin, J. K., Paciorek, C. J., *et al.* (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.
- Forouhi, N. G., Koulman, A., Sharp, S. J., Imamura, F., Kröger, J., Schulze, M. B., *et al.* (2014). Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 2(10), 810–818.
- Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J. T., Bare, O., Lerin, C., Kim, S.-H., Mostoslavsky, R., *et al.* (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *The EMBO journal*, 26(7), 1913–1923.
- Glatz, J. F. C., Luiken, J. J. F. P., & Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiological Reviews*, 90(1), 367–417.
- Grubisha, O., Smith, B. C., & Denu, J. M. (2005). Small molecule regulation of Sir2 protein deacetylases. *The FEBS journal*, 272(18), 4607–4616.
- Gudi, R., Bowker-Kinley, M. M., Kedishvili, N. Y., Zhao, Y., & Popov, K. M. (1995). Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28989–28994.
- Gulick, A. (1995). A study of weight regulation in the adult human body during over-nutrition. 1922. *Obesity Research*, 3(5), 501–512.
- Gundersen, K. (2011). Excitation-transcription coupling in skeletal muscle: the molecular pathways of exercise. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 86(3), 564–600.
- Guyenet, S. J., & Schwartz, M. W. (2012). Clinical review: Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: implications for the pathogenesis and treatment of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(3), 745–755.
- Haigis, M. C., & Sinclair, D. A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annual Review of Pathology*, 5, 253–295.
- Halkjaer, J., Tjønneland, A., Thomsen, B. L., Overvad, K., & Sørensen, T. I. A. (2006). Intake of macronutrients as predictors of 5-y changes in waist circumference. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(4), 789–797.
- Hamilton, G., Yokoo, T., Bydder, M., Cruite, I., Schroeder, M. E., Sirlin, C. B., & Middleton, M.

- S. (2011). In vivo characterization of the liver fat ^1H MR spectrum. *NMR in biomedicine*, 24(7), 784–790.
- Hamilton, J. A., & Kamp, F. (1999). How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids? *Diabetes*, 48(12), 2255–2269.
- Hanover, L. M., & White, J. S. (1993). Manufacturing, composition, and applications of fructose. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 58(5 Suppl), 724S–732S.
- Hardie, D. G., & Ashford, M. L. J. (2014). AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 29(2), 99–107.
- Harris, A. M., Jensen, M. D., & Levine, J. A. (2006). Weekly changes in basal metabolic rate with eight weeks of overfeeding. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 14(4), 690–695.
- Haugen, H. A., Chan, L.-N., & Li, F. (2007). Indirect calorimetry: a practical guide for clinicians. *Nutrition in Clinical Practice: Official Publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, 22(4), 377–388.
- Heilbronn, L. K., Campbell, L. V., Xu, A., & Samocha-Bonet, D. (2013). Metabolically protective cytokines adiponectin and fibroblast growth factor-21 are increased by acute overfeeding in healthy humans. *PloS One*, 8(10), e78864.
- Higgs, S., & Woodward, M. (2009). Television watching during lunch increases afternoon snack intake of young women. *Appetite*, 52(1), 39–43.
- Hill, A. L., Rand, D. G., Nowak, M. A., & Christakis, N. A. (2010). Infectious disease modeling of social contagion in networks. *PLoS computational biology*, 6(11), e1000968.
- Hokayem, M., Blond, E., Vidal, H., Lambert, K., Meugnier, E., Feillet-Coudray, C., et al. (2013). Grape polyphenols prevent fructose-induced oxidative stress and insulin resistance in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Diabetes care*, 36(6), 1454–1461.
- Holness, M. J., & Sugden, M. C. (2003). Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 6), 1143–1151.
- Horton, T. J., Drougas, H., Brachey, A., Reed, G. W., Peters, J. C., & Hill, J. O. (1995). Fat and carbohydrate overfeeding in humans: different effects on energy storage. *The American journal of clinical nutrition*, 62(1), 19–29.
- Houtkooper, R. H., Cantó, C., Wanders, R. J., & Auwerx, J. (2010). The secret life of NAD⁺: an old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine Reviews*, 31(2), 194–223.
- Houtkooper, R. H., Pirinen, E., & Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(4), 225–238.
- Howald, H. (1974). [Effects of sport activities on the metabolism]. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, 104(44), 1535–1538.
- Howarth, N. C., Huang, T. T.-K., Roberts, S. B., Lin, B.-H., & McCrory, M. A. (2007). Eating

- patterns and dietary composition in relation to BMI in younger and older adults. *International Journal of Obesity* (2005), 31(4), 675–684.
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., *et al.* (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954), 191–196.
- Huang, B., Gudi, R., Wu, P., Harris, R. A., Hamilton, J., & Popov, K. M. (1998). Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(28), 17680–17688.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*, 37(1), 1–13.
- Hue, L., & Taegtmeyer, H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 297(3), E578–591.
- Hu, F. B., Li, T. Y., Colditz, G. A., Willett, W. C., & Manson, J. E. (2003). Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and type 2 diabetes mellitus in women. *JAMA*, 289(14), 1785–1791.
- Hulshof, T., De Graaf, C., & Weststrate, J. A. (1993). The effects of preloads varying in physical state and fat content on satiety and energy intake. *Appetite*, 21(3), 273–286.
- Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M., & Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403(6771), 795–800.
- Jacobsen, S. C., Brøns, C., Bork-Jensen, J., Ribel-Madsen, R., Yang, B., Lara, E., *et al.* (2012). Effects of short-term high-fat overfeeding on genome-wide DNA methylation in the skeletal muscle of healthy young men. *Diabetologia*, 55(12), 3341–3349.
- Jacobsen, S. C., Gillberg, L., Bork-Jensen, J., Ribel-Madsen, R., Lara, E., Calvanese, V., *et al.* (2014). Young men with low birthweight exhibit decreased plasticity of genome-wide muscle DNA methylation by high-fat overfeeding. *Diabetologia*, 57(6), 1154–1158.
- Kaeberlein, M., McVey, M., & Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Development*, 13(19), 2570–2580.
- Kant, A. K., Schatzkin, A., Graubard, B. I., & Ballard-Barbash, R. (1995). Frequency of eating occasions and weight change in the NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 19(7), 468–474.
- Kerner, J., & Hoppel, C. (2000). Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1486(1), 1–17.
- Keys, A., Brožek, J., Henschel, A., Mickelsen, O., & L, H. (1950). *The biology of human*

- starvation. (2 vols).* Oxford, England: Univ. of Minnesota Press.
- Kien, C. L., Bunn, J. Y., Tompkins, C. L., Dumas, J. A., Crain, K. I., Ebenstein, D. B., *et al.* (2013). Substituting dietary monounsaturated fat for saturated fat is associated with increased daily physical activity and resting energy expenditure and with changes in mood. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *97*(4), 689–697.
- Kim, J. (2013). Dairy food consumption is inversely associated with the risk of the metabolic syndrome in Korean adults. *Journal of Human Nutrition and Dietetics: The Official Journal of the British Dietetic Association*, *26 Suppl 1*, 171–179.
- Kim, Y. I., Lee, F. N., Choi, W. S., Lee, S., & Youn, J. H. (2006). Insulin regulation of skeletal muscle PDK4 mRNA expression is impaired in acute insulin-resistant states. *Diabetes*, *55*(8), 2311–2317.
- King, H., Aubert, R. E., & Herman, W. H. (1998). Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes care*, *21*(9), 1414–1431.
- Klesges, R. C., Klesges, L. M., Haddock, C. K., & Eck, L. H. (1992). A longitudinal analysis of the impact of dietary intake and physical activity on weight change in adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *55*(4), 818–822.
- Knowler, W. C., Pettitt, D. J., Saad, M. F., Charles, M. A., Nelson, R. G., Howard, B. V., *et al.* (1991). Obesity in the Pima Indians: its magnitude and relationship with diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *53*(6 Suppl), 1543S–1551S.
- Koonen, D. P. Y., Glatz, J. F. C., Bonen, A., & Luiken, J. J. F. P. (2005). Long-chain fatty acid uptake and FAT/CD36 translocation in heart and skeletal muscle. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1736*(3), 163–180.
- Lacour, J.-R. (2011). [Muscle activity and energy expenditure]. *Revue Des Maladies Respiratoires*, *28*(10), 1278–1292.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., *et al.* (2006). Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 α . *Cell*, *127*(6), 1109–1122.
- Lammert, O., Grunnet, N., Faber, P., Bjørnsbo, K. S., Dich, J., Larsen, L. O., *et al.* (2000). Effects of isoenergetic overfeeding of either carbohydrate or fat in young men. *The British Journal of Nutrition*, *84*(2), 233–245.
- Lane, M. D., Moss, J., & Polakis, S. E. (1974). Acetyl coenzyme A carboxylase. *Current Topics in Cellular Regulation*, *8*(0), 139–195.
- Laville, M. (2006). Composantes de la dépense énergétique. L'obésité : un problème d'actualité, une question d'avenir. <http://www.institut-servier.com/download/obesite2/7.pdf>
- Lecoultre, V., Carrel, G., Egli, L., Binnert, C., Boss, A., MacMillan, E. L., *et al.* (2014). Coffee consumption attenuates short-term fructose-induced liver insulin resistance in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *99*(2), 268–275.

- Lê, K.-A., Faeh, D., Stettler, R., Debard, C., Loizon, E., Vidal, H., *et al.* (2008). Effects of four-week high-fructose diet on gene expression in skeletal muscle of healthy men. *Diabetes & Metabolism*, *34*(1), 82–85.
- Lê, K.-A., Faeh, D., Stettler, R., Ith, M., Kreis, R., Vermathen, P., *et al.* (2006). A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(6), 1374–1379.
- Lê, K.-A., Ith, M., Kreis, R., Faeh, D., Bortolotti, M., Tran, C., *et al.* (2009). Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *89*(6), 1760–1765.
- Lissner, L., Levitsky, D. A., Strupp, B. J., Kalkwarf, H. J., & Roe, D. A. (1987). Dietary fat and the regulation of energy intake in human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *46*(6), 886–892.
- Liu, S., Choi, H. K., Ford, E., Song, Y., Klevak, A., Buring, J. E., & Manson, J. E. (2006). A prospective study of dairy intake and the risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care*, *29*(7), 1579–1584.
- Lockyer, S., Corona, G., Yaqoob, P., Spencer, J. P. E., & Rowland, I. (2015). Secoiridoids delivered as olive leaf extract induce acute improvements in human vascular function and reduction of an inflammatory cytokine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *The British Journal of Nutrition*, *114*(1), 75–83.
- Ludwig, D. S., Pereira, M. A., Kroenke, C. H., Hilner, J. E., Van Horn, L., Slattery, M. L., & Jacobs, D. R. (1999). Dietary fiber, weight gain, and cardiovascular disease risk factors in young adults. *JAMA*, *282*(16), 1539–1546.
- Luiken, J. J., Schaap, F. G., van Nieuwenhoven, F. A., van der Vusse, G. J., Bonen, A., & Glatz, J. F. (1999). Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. *Lipids*, *34* Suppl, S169–175.
- Lustig, Y., Ruas, J. L., Estall, J. L., Lo, J. C., Devarakonda, S., Laznik, D., *et al.* (2011). Separation of the gluconeogenic and mitochondrial functions of PGC-1{alpha} through S6 kinase. *Genes & development*, *25*(12), 1232–1244.
- Macedo, R. C. S., Vieira, A., Marin, D. P., & Otton, R. (2015). Effects of chronic resveratrol supplementation in military firefighters undergo a physical fitness test--a placebo-controlled, double blind study. *Chemico-Biological Interactions*, *227*, 89–95.
- Maffei, C. (1999). Childhood obesity: the genetic-environmental interface. *Baillière's Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, *13*(1), 31–46.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, *81*(1 Suppl), 230S–242S.

- Marín-Guerrero, A. C., Gutiérrez-Fisac, J. L., Guallar-Castillón, P., Banegas, J. R., & Rodríguez-Artalejo, F. (2008). Eating behaviours and obesity in the adult population of Spain. *The British Journal of Nutrition*, *100*(5), 1142–1148.
- Markey, O., Vasilopoulou, D., Givens, D. I., & Lovegrove, J. A. (2014). Dairy and cardiovascular health: Friend or foe? *Nutrition bulletin / BNF*, *39*(2), 161–171.
- Martins, M. L. B., Kac, G., Silva, R. A., Bettioli, H., Barbieri, M. A., Cardoso, V. C., & Silva, A. A. M. (2015). Dairy consumption is associated with a lower prevalence of metabolic syndrome among young adults from Ribeirão Preto, Brazil. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *31*(5), 716–721.
- Mattes, R. (2006). Fluid calories and energy balance: the good, the bad, and the uncertain. *Physiology & Behavior*, *89*(1), 66–70.
- Ma, Y., Bertone, E. R., Stanek, E. J., 3rd, Reed, G. W., Hebert, J. R., Cohen, N. L., *et al.* (2003). Association between eating patterns and obesity in a free-living US adult population. *American journal of epidemiology*, *158*(1), 85–92.
- McCance, R. A. (1975). Famines of history and of today. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *34*(3), 161–166.
- McGarry, J. D. (1998). Glucose-fatty acid interactions in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *67*(3 Suppl), 500S–504S.
- McGarry, J. D., Mannaerts, G. P., & Foster, D. W. (1977). A possible role for malonyl-CoA in the regulation of hepatic fatty acid oxidation and ketogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *60*(1), 265–270.
- Medina-Remón, A., Tresserra-Rimbau, A., Pons, A., Tur, J. A., Martorell, M., Ros, E., *et al.* (2015). Effects of total dietary polyphenols on plasma nitric oxide and blood pressure in a high cardiovascular risk cohort. The PREDIMED randomized trial. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD*, *25*(1), 60–67.
- Meugnier, E., Bossu, C., Oliel, M., Jeanne, S., Michaut, A., Sothier, M., *et al.* (2007). Changes in gene expression in skeletal muscle in response to fat overfeeding in lean men. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, *15*(11), 2583–2594.
- Minehira, K., Bettschart, V., Vidal, H., Vega, N., Di Vetta, V., Rey, V., *et al.* (2003). Effect of carbohydrate overfeeding on whole body and adipose tissue metabolism in humans. *Obesity Research*, *11*(9), 1096–1103.
- Miranda, P. J., DeFronzo, R. A., Califf, R. M., & Guyton, J. R. (2005). Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *American Heart Journal*, *149*(1), 33–45.
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., *et al.* (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, *387*(6636), 903–908.
- Mosca, C. L., Marshall, J. A., Grunwald, G. K., Cornier, M. A., & Baxter, J. (2004). Insulin resistance as a modifier of the relationship between dietary fat intake and weight

- gain. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 28(6), 803–812.
- Mozaffarian, D., Hao, T., Rimm, E. B., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2011). Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *The New England Journal of Medicine*, 364(25), 2392–2404.
- Munday, M. R. (2002). Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical Society Transactions*, 30(Pt 6), 1059–1064.
- Munsters, M. J. M., & Saris, W. H. M. (2012). Effects of meal frequency on metabolic profiles and substrate partitioning in lean healthy males. *PloS One*, 7(6), e38632.
- Neel, J. V. (1962). Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *American Journal of Human Genetics*, 14, 353–362.
- Neumann, R. (1902). Experimental determination of human food requirements with particular consideration of essential protein need. *Arch Hyg*.
- Ngo Sock, E. T., Lê, K.-A., Ith, M., Kreis, R., Boesch, C., & Tappy, L. (2010). Effects of a short-term overfeeding with fructose or glucose in healthy young males. *The British Journal of Nutrition*, 103(7), 939–943.
- O’Connor, L. M., Lentjes, M. A. H., Luben, R. N., Khaw, K.-T., Wareham, N. J., & Forouhi, N. G. (2014). Dietary dairy product intake and incident type 2 diabetes: a prospective study using dietary data from a 7-day food diary. *Diabetologia*, 57(5), 909–917.
- Ogiwara, H., Tanabe, T., Nikawa, J., & Numa, S. (1978). Inhibition of rat-liver acetyl-coenzyme-A carboxylase by palmitoyl-coenzyme A. Formation of equimolar enzyme-inhibitor complex. *European journal of biochemistry / FEBS*, 89(1), 33–41.
- Pasarica, M., Gowronska-Kozak, B., Burk, D., Remedios, I., Hymel, D., Gimble, J., et al. (2009). Adipose tissue collagen VI in obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 94(12), 5155–5162.
- Patel, M. S., & Korotchkina, L. G. (2006). Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Society Transactions*, 34(Pt 2), 217–222.
- Piers, L. S., Walker, K. Z., Stoney, R. M., Soares, M. J., & O’Dea, K. (2002). The influence of the type of dietary fat on postprandial fat oxidation rates: monounsaturated (olive oil) vs saturated fat (cream). *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 26(6), 814–821.
- Pilegaard, H., & Neufer, P. D. (2004). Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in skeletal muscle during and after exercise. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 63(2), 221–226.
- Pittas, A. G., Lau, J., Hu, F. B., & Dawson-Hughes, B. (2007). The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(6), 2017–2029.

- Randle, P. J. (1995). Metabolic fuel selection: general integration at the whole-body level. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 54(1), 317–327.
- Randle, P. J., Garland, P. B., Hales, C. N., & Newsholme, E. A. (1963). The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet (London, England)*, 1(7285), 785–789.
- Randle, P. J., Kerbey, A. L., & Espinal, J. (1988). Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 4(7), 623–638.
- Ravussin, E., Schutz, Y., Acheson, K. J., Dusmet, M., Bourquin, L., & Jéquier, E. (1985). Short-term, mixed-diet overfeeding in man: no evidence for “luxusconsumption.” *The American Journal of Physiology*, 249(5 Pt 1), E470–477.
- Rigaud, D., & Melchior, J. (1992). La dépense énergétique : le tout et ses parties. Le Métabolisme énergétique chez l’homme. *Editions Médicales Internationales*, pp. 69–82.
- Ritz, P., Acheson, K. J., Gachon, P., Vico, L., Bernard, J. J., Alexandre, C., & Beaufrère, B. (1998). Energy and substrate metabolism during a 42-day bed-rest in a head-down tilt position in humans. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 78(4), 308–314.
- Rogers, S., Macheda, M. L., Docherty, S. E., Carty, M. D., Henderson, M. A., Soeller, W. C., *et al.* (2002). Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 282(3), E733–738.
- Rowles, J., Scherer, S. W., Xi, T., Majer, M., Nickle, D. C., Rommens, J. M., *et al.* (1996). Cloning and characterization of PDK4 on 7q21.3 encoding a fourth pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme in human. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(37), 22376–22382.
- Roy, D., Jóhannsson, E., Bonen, A., & Marette, A. (1997). Electrical stimulation induces fiber type-specific translocation of GLUT-4 to T tubules in skeletal muscle. *The American Journal of Physiology*, 273(4 Pt 1), E688–694.
- Roy, D., & Marette, A. (1996). Exercise induces the translocation of GLUT4 to transverse tubules from an intracellular pool in rat skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223(1), 147–152.
- Saha, A. K., Schwarsin, A. J., Roduit, R., Masse, F., Kaushik, V., Tornheim, K., *et al.* (2000). Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24279–24283.
- Saks, V. A., Veksler, V. I., Kuznetsov, A. V., Kay, L., Sikk, P., Tiivel, T., *et al.* (1998). Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo. *Molecular and cellular biochemistry*, 184(1-2), 81–100.

- Samocha-Bonet, D., Campbell, L. V., Mori, T. A., Croft, K. D., Greenfield, J. R., Turner, N., & Heilbronn, L. K. (2012). Overfeeding Reduces Insulin Sensitivity and Increases Oxidative Stress, without Altering Markers of Mitochondrial Content and Function in Humans. *PLoS ONE*, 7(5), e36320.
- Samocha-Bonet, D., Campbell, L. V., Viardot, A., Freund, J., Tam, C. S., Greenfield, J. R., & Heilbronn, L. K. (2010). A family history of type 2 diabetes increases risk factors associated with overfeeding. *Diabetologia*, 53(8), 1700–1708.
- Samuelson, G. (2000). Dietary habits and nutritional status in adolescents over Europe. An overview of current studies in the Nordic countries. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54 Suppl 1, S21–28.
- Scarpulla, R. C. (1997). Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 29(2), 109–119.
- Scarpulla, R. C., Vega, R. B., & Kelly, D. P. (2012). Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 23(9), 459–466.
- Schlögl, M., Piaggi, P., Thiyyagura, P., Reiman, E. M., Chen, K., Lutrin, C., *et al.* (2013). Overfeeding over 24 hours does not activate brown adipose tissue in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 98(12), E1956–1960.
- Schulze, M. B., Manson, J. E., Ludwig, D. S., Colditz, G. A., Stampfer, M. J., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2004). Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA*, 292(8), 927–934.
- Schulze, M. B., Schulz, M., Heidemann, C., Schienkiewitz, A., Hoffmann, K., & Boeing, H. (2007). Fiber and magnesium intake and incidence of type 2 diabetes: a prospective study and meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, 167(9), 956–965.
- Shea, J., French, C. R., Bishop, J., Martin, G., Roebathan, B., Pace, D., *et al.* (2009). Changes in the transcriptome of abdominal subcutaneous adipose tissue in response to short-term overfeeding in lean and obese men. *The American journal of clinical nutrition*, 89(1), 407–415.
- Siervo, M., Frühbeck, G., Dixon, A., Goldberg, G. R., Coward, W. A., Murgatroyd, P. R., *et al.* (2008). Efficiency of autoregulatory homeostatic responses to imposed caloric excess in lean men. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 294(2), E416–424.
- Simonson, D. C., & DeFronzo, R. A. (1990). Indirect calorimetry: methodological and interpretative problems. *The American journal of physiology*, 258(3 Pt 1), E399–412.
- Siri-Tarino, P. W., Sun, Q., Hu, F. B., & Krauss, R. M. (2010). Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, ajcn.27725.
- Sluijs, I., Forouhi, N. G., Beulens, J. W. J., van der Schouw, Y. T., Agnoli, C., Arriola, L., *et al.* (2012). The amount and type of dairy product intake and incident type 2 diabetes:

- results from the EPIC-InterAct Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(2), 382–390.
- Smedman, A. E., Gustafsson, I. B., Berglund, L. G., & Vessby, B. O. (1999). Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(1), 22–29.
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, 3, Article3.
- Solomon, T. P. J., Chambers, E. S., Jeukendrup, A. E., Toogood, A. A., & Blannin, A. K. (2008). The effect of feeding frequency on insulin and ghrelin responses in human subjects. *The British journal of nutrition*, 100(4), 810–819.
- Speakman, J. R. (2006). Thrifty genes for obesity and the metabolic syndrome--time to call off the search? *Diabetes & Vascular Disease Research*, 3(1), 7–11.
- Spiegelman, B. M., & Flier, J. S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*, 104(4), 531–543.
- Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Graham, J. L., *et al.* (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1322–1334.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550.
- Swinburn, B., & Ravussin, E. (1993). Energy balance or fat balance? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5 Suppl), 766S–770S; discussion 770S–771S.
- Tang, Y., Sharma, P., Nelson, M. D., Simerly, R., & Moats, R. A. (2011). Automatic abdominal fat assessment in obese mice using a segmental shape model. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*, 34(4), 866–873.
- Tappy, L., & Lê, K.-A. (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological Reviews*, 90(1), 23–46.
- Temple, J. L., Giacomelli, A. M., Kent, K. M., Roemmich, J. N., & Epstein, L. H. (2007). Television watching increases motivated responding for food and energy intake in children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 355–361.
- Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R. H., van de Weijer, T., Goossens, G. H., *et al.* (2011). Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell metabolism*, 14(5), 612–622.
- Tomé-Carneiro, J., González, M., Larrosa, M., García-Almagro, F. J., Avilés-Plaza, F., Parra, S.,

- et al.* (2012). Consumption of a grape extract supplement containing resveratrol decreases oxidized LDL and ApoB in patients undergoing primary prevention of cardiovascular disease: a triple-blind, 6-month follow-up, placebo-controlled, randomized trial. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(5), 810–821.
- Trumble, G. E., Smith, M. A., & Winder, W. W. (1995). Purification and characterization of rat skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. *European journal of biochemistry / FEBS*, 231(1), 192–198.
- Tucker, L. A., & Bagwell, M. (1991). Television viewing and obesity in adult females. *American Journal of Public Health*, 81(7), 908–911.
- Tucker, L. A., & Friedman, G. M. (1989). Television viewing and obesity in adult males. *American Journal of Public Health*, 79(4), 516–518.
- Turcotte, L. P., Swenberger, J. R., Tucker, M. Z., & Yee, A. J. (1999). Training-induced elevation in FABP(PM) is associated with increased palmitate use in contracting muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 87(1), 285–293.
- Vague, J. (1956). The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 4(1), 20–34.
- Vienberg, S. G., Brøns, C., Nilsson, E., Astrup, A., Vaag, A., & Andersen, B. (2012). Impact of short-term high-fat feeding and insulin-stimulated FGF21 levels in subjects with low birth weight and controls. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 167(1), 49–57.
- Virbasius, J. V., & Scarpulla, R. C. (1994). Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(4), 1309–1313.
- Vitaglione, P., Mennella, I., Ferracane, R., Rivellese, A. A., Giacco, R., Ercolini, D., *et al.* (2015). Whole-grain wheat consumption reduces inflammation in a randomized controlled trial on overweight and obese subjects with unhealthy dietary and lifestyle behaviors: role of polyphenols bound to cereal dietary fiber. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(2), 251–261.
- Votruba, S. B., Zeddun, S. M., & Schoeller, D. A. (2001). Validation of deuterium labeled fatty acids for the measurement of dietary fat oxidation: a method for measuring fat-oxidation in free-living subjects. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 25(8), 1240–1245.
- Walker, R. W., Dumke, K. A., & Goran, M. I. (2014). Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30(7-8), 928–935.

- Wang, H., Troy, L. M., Rogers, G. T., Fox, C. S., McKeown, N. M., Meigs, J. B., & Jacques, P. F. (2014). Longitudinal association between dairy consumption and changes of body weight and waist circumference: the Framingham Heart Study. *International Journal of Obesity (2005)*, *38*(2), 299–305.
- Warram, J. H., Martin, B. C., Krolewski, A. S., Soeldner, J. S., & Kahn, C. R. (1990). Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Annals of Internal Medicine*, *113*(12), 909–915.
- Welle, S. L., & Campbell, R. G. (1983). Improved carbohydrate tolerance and stimulation of carbohydrate oxidation and lipogenesis during short-term carbohydrate overfeeding. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *32*(9), 889–893.
- Welsh, J. A., Sharma, A., Abramson, J. L., Vaccarino, V., Gillespie, C., & Vos, M. B. (2010). Caloric sweetener consumption and dyslipidemia among US adults. *JAMA*, *303*(15), 1490–1497.
- Wende, A. R., Huss, J. M., Schaeffer, P. J., Giguère, V., & Kelly, D. P. (2005). PGC-1 α coactivates PDK4 gene expression via the orphan nuclear receptor ERR α : a mechanism for transcriptional control of muscle glucose metabolism. *Molecular and cellular biology*, *25*(24), 10684–10694.
- Wolk, A., Vessby, B., Ljung, H., & Barrefors, P. (1998). Evaluation of a biological marker of dairy fat intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *68*(2), 291–295.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., *et al.* (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, *98*(1), 115–124.
- Yeo, G. S. H., Lank, E. J., Farooqi, I. S., Keogh, J., Challis, B. G., & O’Rahilly, S. (2003). Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Human Molecular Genetics*, *12*(5), 561–574.
- Yki-Järvinen, H., Mott, D., Young, A. A., Stone, K., & Bogardus, C. (1987). Regulation of glycogen synthase and phosphorylase activities by glucose and insulin in human skeletal muscle. *Journal of Clinical Investigation*, *80*(1), 95–100.
- Zurlo, F., Larson, K., Bogardus, C., & Ravussin, E. (1990). Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. *The Journal of Clinical Investigation*, *86*(5), 1423–1427.

Annexes

LISTE DES ANNEXES :

Annexes Article 1 :

Annexe 1 : Supplementary figure 1 : blood kinetics of glucose, insulin and NEFA

Annexe 2 : Supplementary table 1: Characteristics of the subjects

- a) Characteristics of the subjects involved in the microarrays analysis (n=12)
- b) Characteristics of the subjects involved in the test meal study (n=12)
- c) Characteristics of the subjects involved in the RT-qPCR analysis (n=20)

Annexe 3 : Supplementary table 2: Primer sequences of the studied genes by real-time quantitative PCR

Annexe 4 : Supplementary table 3: List of the 821 Probe Sets regulated in skeletal muscle during a 56 days of fat overfeeding

Annexes Article 2 :

Annexe 5 : Supplementary table 1: List of the 544 probe sets regulated in skeletal muscle after 7 days of HFrD

Annexe 6 : Supplementary table 2: List of the 100 most co-regulated genes associated with CPT1B, MYLCD and HADHA expression.

Annexes Articles en lien avec le travail de thèse :

Annexe 7 : Le tissu adipeux : couleur, localisation, fonctions et autres données nouvelles

Annexe 8 : Dairy biomarker divergence

Autres Articles :

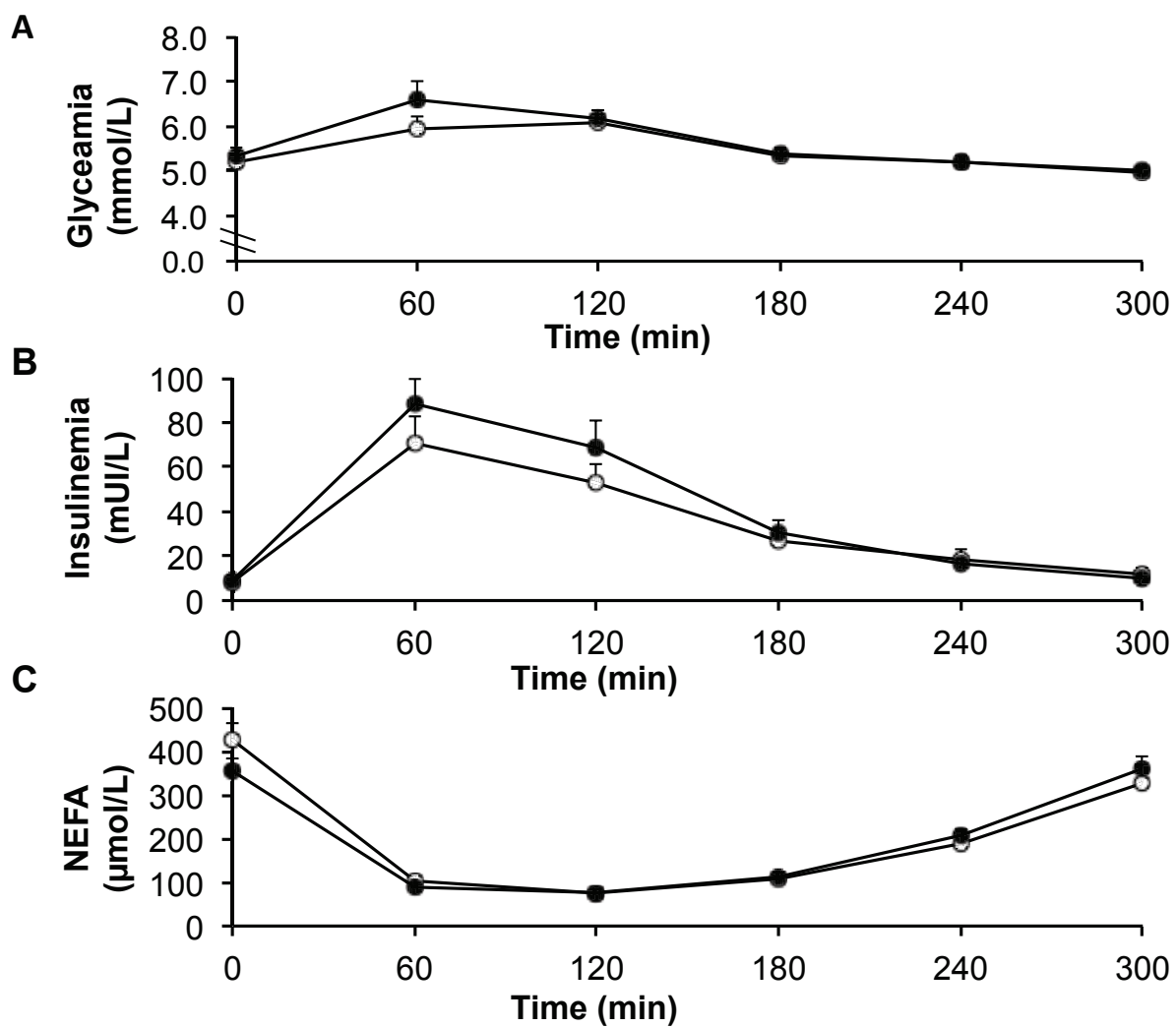
Annexe 9 : An isocaloric increase of eating episodes in the morning contributes to decrease energy intake at lunch in men

Annexe 10 : Effects of breakfast spread out over time on the food intake at lunch and the hormonal responses in obese men

ANNEXES ARTICLE 1 :

Regulation of Energy Metabolism and
Mitochondrial Function in Skeletal Muscle
During Lipid Overfeeding in Healthy Men

Annexe 1: Supplementary figure 1: Glucose (A), insulin (B) and NEFA (C) plasma concentrations during the test meal at D0 (○) and at D56 (●) (n = 12). Data are means ± SEM.



Annexe 2: Supplementary table 1: Characteristics of the subjects

a) Characteristics of the subjects involved in the microarrays analysis (n=12)

| Parameters | D0 | D56 |
|---|-------------|----------------|
| N | 12 | 12 |
| Age (years) | 31 ± 3 | - |
| Antropometric parameters | | |
| Body weight (kg) | 78.0 ± 2.3 | 80.2 ± 2.3 *** |
| Weight gain (kg) | - | 2.21 ± 0.34 |
| Waist circumference (cm) | 88.0 ± 2.6 | 90.4 ± 2.7 *** |
| Fat mass (%) | 20.7 ± 1.9 | 20.9 ± 1.8 |
| Subcutaneous adipose volume (cm ³) | 176 ± 19 | 196 ± 27 * |
| Visceral adipose volume (cm ³) | 200 ± 46 | 214 ± 48 |
| Intra hepatic lipid content % | 14 ± 2 | 15 ± 2 ** |
| Metabolic parameters | | |
| Fasting glucose (mM) | 5.15 ± 0.09 | 5.33 ± 0.11 |
| Fasting insulin (pmol/L) | 9.0 ± 0.4 | 10.3 ± 0.5 * |
| HOMA | 2.06 ± 0.09 | 2.46 ± 0.15 * |
| Fasting triacylglycerols (mM) | 871 ± 108 | 898 ± 124 |
| Fasting free fatty acids (μM) | 427 ± 34 | 389 ± 39 |
| Total cholesterol (mM) | 4.5 ± 0.2 | 4.5 ± 0.2 |
| Respiratory quotient | 0.80 ± 0.01 | 0.83 ± 0.02 ** |
| Lipid oxidation rate (mg/kg per min) | 0.95 ± 0.07 | 0.79 ± 0.08 * |
| Carbohydrate oxidation rate (mg/kg per min) | 1.09 ± 0.19 | 1.51 ± 0.26 * |
| Resting metabolic rate (kJ/d) | 7481 ± 229 | 7658 ± 263 |
| Mean ± SEM | | |
| *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 using student paired t-test | | |

b) Characteristics of the subjects involved in the test meal study ($n=12$)

| Parameters | D0 | D56 |
|---|-------------|----------------|
| n | 12 | 12 |
| Age (years) | 28 ± 2 | - |
| Antropometric parameters | | |
| Body weight (kg) | 78.8 ± 3.5 | 81.7 ± 3.7 *** |
| Weight gain (kg) | - | 2.89 ± 0.53 |
| Waist circumference (cm) | 84.9 ± 2.6 | 87.8 ± 2.6 *** |
| Fat mass (%) | 19.9 ± 2.0 | 20.5 ± 2.0 |
| Subcutaneous adipose volume (cm ³) | 166 ± 27 | 192 ± 31 *** |
| Visceral adipose volume (cm ³) | 135 ± 29 | 148 ± 28 |
| Intra hepatic lipid content % | 14 ± 2 | 17 ± 3 |
| Metabolic parameters | | |
| Fasting glucose (mM) | 5.20 ± 0.11 | 5.39 ± 0.15 * |
| Fasting insulin (pmol/L) | 9.1 ± 0.9 | 10.0 ± 0.8 * |
| HOMA | 2.1 ± 0.2 | 2.4 ± 0.2 * |
| Fasting triacylglycerols (mM) | 983 ± 143 | 948 ± 139 |
| Fasting free fatty acids (μM) | 465 ± 27 | 394 ± 26 * |
| Total cholesterol (mM) | 4.6 ± 0.2 | 4.6 ± 0.2 |
| Respiratory quotient | 0.80 ± 0.01 | 0.81 ± 0.01 |
| Lipid oxidation rate (mg/kg per min) | 0.91 ± 0.07 | 0.79 ± 0.05 * |
| Carbohydrate oxidation rate (mg/kg per min) | 1.03 ± 0.13 | 1.04 ± 0.14 |
| Resting metabolic rate (kJ/d) | 7449 ± 223 | 7518 ± 247 |
| Mean ± SEM | | |
| *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$ using student paired t-test | | |

c) Characteristics of the subjects involved in the RT-qPCR analysis (n=20)

| Parameters | D0 | D56 |
|---|-------------|---------------------|
| n | 20 | 20 |
| Age (years) | 32 ± 2 | - |
| Antropometric parameters | | |
| Body weight (kg) | 78.2 ± 2.2 | 80.9 ± 2.2 *** |
| Weight gain (kg) | - | 2.64 ± 0.26 |
| Waist circumference (cm) | 88.8 ± 1.9 | 91.4 ± 2.0 *** |
| Fat mass (%) | 20.3 ± 1.3 | 21.0 ± 1.3 (p=0.06) |
| Subcutaneous adipose volume (cm ³) | 188 ± 21 | 200 ± 22 ** |
| Visceral adipose volume (cm ³) | 197 ± 32 | 206 ± 32 |
| Intra hepatic lipid content % | 13 ± 1 | 16 ± 2 *** |
| Metabolic parameters | | |
| Fasting glucose (mM) | 5.09 ± 0.08 | 5.17 ± 0.09 |
| Fasting insulin (pmol/L) | 9.4 ± 0.4 | 9.8 ± 0.4 |
| HOMA | 2.11 ± 0.09 | 2.25 ± 0.10 |
| Fasting triacylglycerols (mM) | 1066 ± 138 | 952 ± 89 |
| Fasting free fatty acids (μM) | 408 ± 25 | 369 ± 26 (p=0.08) |
| Total cholesterol (mM) | 4.7 ± 0.2 | 4.7 ± 0.2 |
| Respiratory quotient | 0.82 ± 0.01 | 0.84 ± 0.01 * |
| Lipid oxidation rate (mg/kg per min) | 0.83 ± 0.06 | 0.72 ± 0.05 * |
| Carbohydrate oxidation rate (mg/kg per min) | 1.47 ± 0.19 | 1.72 ± 0.21 * |
| Resting metabolic rate (kJ/d) | 7163 ± 190 | 7446 ± 190 * |
| Mean ± SEM | | |
| *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 using student paired t-test | | |

Annexe 3: Supplementary table 2: Primer sequences of the studied genes by real-time quantitative PCR

| Gene name | Gene symbol | Forward Primer Sequence | Reverse Primer Sequence |
|---|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Fatty acid binding protein 3 | FABP3 | AAGCTAGTGGACAGCAAGAA | GATCTCTGTGTTCTTGAAGG |
| Acetyl-CoA carboxylase alpha | ACACA | GAGCAAGGGATAAGTTTGAG | AGGTGCATCTTGATTAGC |
| Stearoyl-CoA desaturase | SCD | ACCTGGCTGGTGAACAGTGC | GGTGAAGTTGATGTGCCACG |
| Diacylglycerol O-acyltransferase 2 | DGAT2 | AAGGGCTTTGTGAAACTGGC | CCTCCTCGAAGATCACCTGC |
| Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase alpha subunit | HADHA | GGGAAAGTCATCATTGTGG | ACTCCTTCTTGAGGATTC |
| Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 | PDK4 | TGATGGATAATTCGGGAATG | GTAGAGATTCAGATCTCCTTG |
| Carnitine palmitoyltransferase 1 (muscle isoform) | CPT1 | TACAACAGGTGGTTTGACA | CAGAGGTGCCCAATGATG |
| Malonyl-CoA decarboxylase | MLYCD | ATCTCCAGCAACATCCAGG | TGAGGAATGTTCCCAAGCTCC |
| Uncoupling protein 3 | UCP3 | ATGGAGCCTACAGAAACCAT | CTGGGCCACCATTATATCA |
| PPARGamma Coactivator 1 alpha | PGC-1α | TCCTCTGACCCCAGAGTCACT | CTTGTTGGCTTATGAGGAGG |
| Peroxisome proliferator-activated receptor alpha | PPARα | GCTATCATTACGGAGTCCACG | AGCTGCCGGTCCCACTTGTC |
| Peroxisome proliferator-activated receptor beta | PPARβ | ACTGCCGCTTCCAGAAGTGC | GCCACCAGCTTCCCTTCTC |
| Polymerase (DNA directed) gamma 1 | POLG | GCGGCTGGTGAAGAGCGTT | GAGATGGCCATGTGCATGCTC |
| Sirtuin 1 | SIRT1 | TGAGAAAAATGCTGGCCTAATA | GATAAGACGTCATCTTCAGAG |
| Sirtuin 3 | SIRT3 | CCGACATTGTTCTTTGG | TCAAAGCTGGCAAAAAGGCTC |

Annexe 4: Supplementary table 3: List of the 821 Probe Sets regulated in skeletal muscle during a 56 days of fat overfeeding

| Probe Set ID | p-value | FC D56/0 | Gene Name | Symbol | Cytoband | LIID |
|--------------|---------|----------|---|-----------|--------------|--------|
| 200832_s_at | 0.00234 | 3.00 | stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) | SCD | 10q24.31 | 6319 |
| 223839_s_at | 0.00767 | 2.60 | stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) | SCD | 10q24.31 | 6319 |
| 205694_at | 0.00014 | 1.45 | tyrosinase-related protein 1 | TYRP1 | 9p23 | 7306 |
| 205594_at | 0.00274 | 1.45 | zinc finger protein 652 | ZNF652 | 17q21.32 | 22834 |
| 209160_at | 0.00109 | 1.42 | dehydrogenase, type II) | AKR1C3 | 10p15-p14 | 8644 |
| 206306_at | 0.00163 | 1.41 | ryanodine receptor 3 | RYR3 | 15q14-q15 | 6263 |
| 209699_x_at | 0.00021 | 1.39 | aldo-keto reductase family 1, member C2 | AKR1C2 | 10p15-p14 | 1646 |
| 208383_s_at | 0.02570 | 1.36 | phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble) | PCK1 | 20q13.31 | 5105 |
| 204802_at | 0.02970 | 1.35 | Ras-related associated with diabetes | RRAD | 16q22 | 6236 |
| 204151_x_at | 0.00056 | 1.35 | aldo-keto reductase family 1, member C1 | AKR1C1 | 10p15-p14 | 1645 |
| 212185_x_at | 0.04710 | 1.34 | metallothionein 2A | MT2A | 16q13 | 4502 |
| 1562921_at | 0.00091 | 1.34 | E1A binding protein p300 | EP300 | 22q13.2 | 2033 |
| 218469_at | 0.00563 | 1.33 | gremlin 1 | GREM1 | 15q13.3 | 26585 |
| 210519_s_at | 0.00124 | 1.32 | NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 | NQO1 | 16q22.1 | 1728 |
| 211653_x_at | 0.00080 | 1.31 | aldo-keto reductase family 1, member C2 | AKR1C2 | 10p15-p14 | 1646 |
| 212527_at | 0.00001 | 1.30 | desumoylating isopeptidase 1 | DES1 | 22q13.2 | 27351 |
| 216594_x_at | 0.00084 | 1.30 | aldo-keto reductase family 1, member C1 (| AKR1C1 | 10p15-p14 | 1645 |
| 236089_at | 0.00919 | 1.29 | clone IMAGE:1844648 | | | |
| 1559170_at | 0.00169 | 1.29 | ankyrin repeat domain 20 family, member A5 | ANKRD20A5 | 18p11.21 | 440482 |
| 236514_at | 0.00282 | 1.28 | acyl-CoA thioesterase 8 | ACOT8 | 20q13.12 | 10005 |
| 225345_s_at | 0.00612 | 1.27 | F-box protein 32 | FBXO32 | 8q24.13 | 114907 |
| 210290_at | 0.00737 | 1.27 | zinc finger protein 174 | ZNF174 | 16p13.3 | 7727 |
| 209911_x_at | 0.00028 | 1.27 | histone cluster 1, H2bd | HIST1H2BD | 6p21.3 | 3017 |
| 228542_at | 0.00002 | 1.27 | MRS2 magnesium homeostasis factor homolog (S. cerevisiae) | MRS2 | 6p22.3-p22.1 | 57380 |
| 211981_at | 0.00187 | 1.27 | collagen, type IV, alpha 1 | COL4A1 | 13q34 | 1282 |
| 243918_at | 0.00712 | 1.27 | kelch-like 24 (Drosophila) | KLHL24 | 3q27.1 | 54800 |

| | | | | | | |
|-------------|---------|------|--|---------|---------------|--------|
| 209817_at | 0.00518 | 1.26 | protein phosphatase 3, catalytic subunit, beta isozyme | PPP3CB | 10q22.2 | 5532 |
| 225283_at | 0.00162 | 1.26 | arrestin domain containing 4 | ARRDC4 | 15q26.3 | 91947 |
| 225420_at | 0.00086 | 1.26 | glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial | GPAM | 10q25.2 | 57678 |
| 223082_at | 0.00986 | 1.26 | SH3-domain kinase binding protein 1 | SH3KBP1 | Xp22.1-p21.3 | 30011 |
| 242888_at | 0.00168 | 1.26 | proline-rich transmembrane protein 3 | PRRT3 | 3p25.3 | 285368 |
| 228186_s_at | 0.00288 | 1.26 | R-spondin 3 | RSPO3 | 6q22.33 | 84870 |
| 229588_at | 0.00119 | 1.25 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 10 | DNAJC10 | 2q32.1 | 54431 |
| 224327_s_at | 0.00343 | 1.25 | diacylglycerol O-acyltransferase 2 | DGAT2 | 11q13.5 | 84649 |
| 201563_at | 0.00003 | 1.25 | sorbitol dehydrogenase | SORD | 15q15.3 | 6652 |
| 230302_at | 0.00031 | 1.25 | cDNA clone ZD68B12 | | | |
| 227742_at | 0.00330 | 1.25 | chloride intracellular channel 6 | CLIC6 | 21q22.12 | 54102 |
| 216336_x_at | 0.02530 | 1.24 | metallothionein 1E | MT1E | 16q13 | 4493 |
| 236828_at | 0.00129 | 1.24 | clone IMAGE-1603063 | | | |
| 205738_s_at | 0.01880 | 1.24 | fatty acid binding protein 3, muscle and heart | FABP3 | 1p33-p32 | 2170 |
| 228949_at | 0.00161 | 1.23 | wntless homolog (Drosophila) | WLS | 1p31.3 | 79971 |
| 235921_at | 0.00011 | 1.23 | clone IMAGE:2398445 | | | |
| 203589_s_at | 0.00065 | 1.23 | transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2) | TFDP2 | 3q23 | 7029 |
| 218434_s_at | 0.00557 | 1.23 | acetoacetyl-CoA synthetase | AACS | 12q24.31 | 65985 |
| 225327_at | 0.00488 | 1.23 | family with sequence similarity 214, member A | FAM214A | 15q21.2-q21.3 | 56204 |
| 204404_at | 0.00071 | 1.23 | member 2 | SLC12A2 | 5q23.3 | 6558 |
| 242600_at | 0.00046 | 1.22 | FERM domain containing 3 | FRMD3 | 9q21.32 | 257019 |
| 208964_s_at | 0.00306 | 1.22 | fatty acid desaturase 1 | FADS1 | 11q12.2-q13.1 | 3992 |
| 222406_s_at | 0.00094 | 1.22 | proline-rich nuclear receptor coactivator 2 | PNRRC2 | 1p36.11 | 55629 |
| 201468_s_at | 0.00187 | 1.22 | NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 | NQO1 | 16q22.1 | 1728 |
| 224435_at | 0.00124 | 1.22 | family with sequence similarity 213, member A | FAM213A | 10q23.1 | 84293 |
| 215076_s_at | 0.00936 | 1.22 | collagen, type III, alpha 1 | COL3A1 | 2q31 | 1281 |
| 223853_at | 0.00133 | 1.22 | blood vessel epicardial substance | BVES | 6q21 | 11149 |
| 214071_at | 0.00850 | 1.21 | activity polypeptide, olfactory type | GNAL | 18p11.21 | 65258 |
| 228824_s_at | 0.00352 | 1.21 | prostaglandin reductase 1 | PTGR1 | 9q31.3 | 22949 |
| 223908_at | 0.00216 | 1.21 | histone deacetylase 8 | HDAC8 | Xq13 | 55869 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|--|----------|---------------|--------|
| 208470_s_at | 0.00134 | 1.21 | haptoglobin-related protein; haptoglobin | HP | 16q22.2 | 3240 |
| 202404_s_at | 0.00556 | 1.21 | collagen, type I, alpha 2 | COL1A2 | 7q22.1 | 1278 |
| 220272_at | 0.00657 | 1.21 | basonudin 2 | BNC2 | 9p22.2 | 54796 |
| 214033_at | 0.00031 | 1.21 | ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6 | ABCC6 | 16p13.11 | 730013 |
| 1558487_a_at | 0.00113 | 1.21 | transmembrane emp24 protein transport domain containing 4 | TMED4 | 7p13 | 222068 |
| 242775_at | 0.00327 | 1.21 | prostaglandin reductase 1 | PTGR1 | 9q31.3 | 22949 |
| 231926_at | 0.00699 | 1.21 | epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1 | EPS15L1 | 19p13.11 | 58513 |
| 212646_at | 0.00027 | 1.20 | raftlin, lipid raft linker 1 | RFTN1 | 3p24.3 | 23180 |
| 214136_at | 0.00041 | 1.20 | nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 13 | NUDT13 | 10q22.1 | 25961 |
| 1559681_a_at | 0.00740 | 1.20 | tripartite motif containing 16-like | TRIM16L | 17p11.2 | 147166 |
| 231916_at | 0.00028 | 1.20 | exosome component 6 | EXOSC6 | 16q22.1 | 118460 |
| 238154_at | 0.00763 | 1.20 | centrosomal protein 70kDa | CEP70 | 3q22.3 | 80321 |
| 211572_s_at | 0.00006 | 1.20 | solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2 | SLC23A2 | 20p13 | 9962 |
| 226073_at | 0.00009 | 1.20 | transmembrane protein 218 | TMEM218 | 11q24.2 | 219854 |
| 214315_x_at | 0.00210 | 1.20 | calreticulin | CALR | 19p13.3-p13.2 | 811 |
| 219848_s_at | 0.00052 | 1.20 | zinc finger protein 432 | ZNF432 | 19q13.41 | 9668 |
| 235391_at | 0.00191 | 1.20 | family with sequence similarity 92, member A1 | FAM92A1 | 8q22.1 | 137392 |
| 238646_at | 0.00271 | 1.20 | clathrin, heavy chain (Hc) | CLTC | 17q11-qter | 1213 |
| 226697_at | 0.00404 | 1.20 | family with sequence similarity 114, member A1 | FAM114A1 | 4p14 | 92689 |
| 236515_at | 0.00002 | 1.19 | clone IMAGE:1648298 | | | |
| 226145_s_at | 0.00867 | 1.19 | Fraser syndrome 1 | FRAS1 | 4q21.21 | 80144 |
| 201730_s_at | 0.00417 | 1.19 | translocated promoter region, nuclear basket protein | TPR | 1q25 | 7175 |
| 205345_at | 0.00509 | 1.19 | BRCA1 associated RING domain 1 | BRAD1 | 2q34-q35 | 580 |
| 203123_s_at | 0.00558 | 1.19 | solute carrier family 11 | SLC11A2 | 12q13 | 4891 |
| 219785_s_at | 0.00259 | 1.19 | F-box protein 31 | FBXO31 | 16q24.2 | 79791 |
| 214211_at | 0.00663 | 1.19 | ferritin, heavy polypeptide 1 | FTH1 | 11q13 | 2495 |
| 201538_s_at | 0.00025 | 1.19 | dual specificity phosphatase 3 | DUSP3 | 17q21 | 1845 |
| 226488_at | 0.00194 | 1.19 | RCC1 domain containing 1 | RCCD1 | 15q26.1 | 91433 |
| 241741_at | 0.00293 | 1.19 | cardiolipin synthase 1 | CRLS1 | 20p13-p12.3 | 54675 |
| 228775_at | 0.00069 | 1.19 | ER membrane protein complex subunit 3 | EMC3 | 3p25.3 | 55831 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|--|--------------|--------------|-----------|
| 235990_at | 0.00086 | 1.19 | uncharacterized LOC100130987 | LOC100130987 | 11q13.2 | 100130987 |
| 223339_at | 0.00139 | 1.19 | ATPase inhibitory factor 1 | ATPIF1 | 1p35.3 | 93974 |
| 210619_s_at | 0.00708 | 1.19 | hyaluronoglucosaminidase 1 | HVAL1 | 3p21.3-p21.2 | 3373 |
| 203588_s_at | 0.00074 | 1.18 | transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2) | TFDP2 | 3q23 | 7029 |
| 238854_at | 0.00371 | 1.18 | uncharacterized LOC100506668 | LOC100506668 | | 100506668 |
| 1569349_at | 0.00389 | 1.18 | chromosome 11 open reading frame 30 | C11orf30 | 11q13.5 | 56946 |
| 242655_at | 0.00936 | 1.18 | BRCA1 associated RING domain 1 | BARL1 | 2q34-q35 | 580 |
| 1553055_a_at | 0.00065 | 1.18 | schlafen family member 5 | SLFN5 | 17q12 | 162394 |
| 205496_at | 0.00867 | 1.18 | KIAA0408; chromosome 6 open reading frame 174 | KIAA0408 | 6q22.33 | 9729 |
| 1553978_at | 0.00022 | 1.18 | MEF2B neighbor | MEF2BNB | 19p13.11 | 729991 |
| 208886_at | 0.00361 | 1.18 | H1 histone family, member 0 | H1F0 | 22q13.1 | 3005 |
| 224323_s_at | 0.00712 | 1.18 | maestro | MRO | 18q21 | 83876 |
| 1554384_at | 0.00422 | 1.18 | peptidyl arginine deiminase, type II | PADI2 | 1p36.13 | 11240 |
| 223212_at | 0.00004 | 1.18 | zinc finger, DHHC-type containing 16 | ZDHHC16 | 10q24.1 | 84287 |
| 223479_s_at | 0.00006 | 1.18 | coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 5 | CHCHD5 | 2q13 | 84269 |
| 243748_at | 0.00541 | 1.18 | eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3 | EIF4E3 | 3p14 | 317649 |
| 242826_at | 0.00733 | 1.18 | hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12 | HSD17B12 | 11p11.2 | 51144 |
| 1555905_a_at | 0.00818 | 1.18 | chromosome 3 open reading frame 23 | C3orf23 | 3p21.31 | 285343 |
| 217511_at | 0.00067 | 1.18 | Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 1 | KAZALD1 | 10q24.31 | 81621 |
| 243303_at | 0.00497 | 1.18 | enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1 | ECHDC1 | 6q22.33 | 55862 |
| 229256_at | 0.00829 | 1.18 | phosphoglucomutase 2-like 1 | PGM2L1 | 11q13.4 | 283209 |
| 1553961_s_at | 0.00027 | 1.17 | sorting nexin family member 21 | SNX21 | 20q13.12 | 90203 |
| 217756_x_at | 0.00057 | 1.17 | small EDRK-rich factor 2 | SERF2 | 15q15.3 | 10169 |
| 235320_at | 0.00486 | 1.17 | ADP-ribosylation factor-like 6 | ARL6 | 3q11.2 | 84100 |
| 212186_at | 0.00065 | 1.17 | acetyl-CoA carboxylase alpha | ACACA | 17q21 | 31 |
| 221514_at | 0.00075 | 1.17 | UTP14, U3 small nucleolar ribonucleoprotein, homolog A (Yeast) | UTP14A | Xq26.1 | 10813 |
| 226899_at | 0.00159 | 1.17 | unc-5 homolog B (C. elegans) | UNC5B | 10q22.1 | 219699 |
| 204263_s_at | 0.00785 | 1.17 | carnitine palmitoyltransferase 2 | CPT2 | 1p32 | 1376 |
| 211406_at | 0.00050 | 1.17 | immediate early response 3 interacting protein 1 | IER3IP1 | 18q12 | 51124 |
| 209939_x_at | 0.00251 | 1.17 | CASP8 and FADD-like apoptosis regulator | CFLAR | 2q33-q34 | 8837 |

| | | | | | | | | |
|-------------|---------|------|--|--|--------------|--------------|-----------|----|
| 213424_at | 0.00613 | 1.17 | KIAA0895 | | KIAA0895 | 7p14.2 | 23366 | 91 |
| 235628_x_at | 0.00757 | 1.17 | uncharacterized LOC644873 | | FLI33630 | 5q23.3 | 644873 | |
| 238787_at | 0.00862 | 1.17 | DENN/MADD domain containing 1B | | DENND1B | 1q31.3 | 163486 | |
| 228737_at | 0.00169 | 1.17 | TOX high mobility group box family member 2 | | TOX2 | 20q13.12 | 84969 | |
| 201467_s_at | 0.00701 | 1.17 | NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1 | | NQO1 | 16q22.1 | 1728 | |
| 243868_at | 0.00960 | 1.17 | regulatory factor X, 3 (influences HLA class II expression) | | RFX3 | 9p24.2 | 5991 | |
| 211561_x_at | 0.00004 | 1.17 | mitogen-activated protein kinase 14 | | MAPK14 | 6p21.3-p21.2 | 1432 | |
| 224061_at | 0.00177 | 1.17 | indolethylamine N-methyltransferase | | INMT | 7p15.1 | 11185 | |
| 225726_s_at | 0.00386 | 1.17 | pleckstrin homology domain containing, family H | | PLEKH11 | 14q24.1 | 57475 | |
| 243864_at | 0.00021 | 1.17 | coiled-coil domain containing 80 | | CCDC80 | 3q13.2 | 151887 | |
| 201953_at | 0.00030 | 1.17 | calcium and integrin binding 1 (calmyrin) | | CIB1 | 15q25.3-q26 | 10519 | |
| 1552485_at | 0.00134 | 1.17 | lactamase, beta | | LACTB | 15q22.1 | 114294 | |
| 223852_s_at | 0.00878 | 1.17 | serine/threonine kinase 40 | | STK40 | 1p34.3 | 83931 | |
| 219406_at | 0.00054 | 1.17 | chromosome 1 open reading frame 50 | | C1orf50 | 1p34.2 | 79078 | |
| 219234_x_at | 0.00095 | 1.17 | secernin 3 | | SCRN3 | 2q31.1 | 79634 | |
| 224634_at | 0.00143 | 1.17 | G patch domain containing 4 | | GPATCH4 | 1q22 | 54865 | |
| 203042_at | 0.00988 | 1.17 | lysosomal-associated membrane protein 2 | | LAMP2 | Xq24 | 3920 | |
| 228946_at | 0.00122 | 1.17 | inturned planar cell polarity effector homolog (<i>Drosophila</i>) | | INTU | 4q28.1 | 27152 | |
| 204175_at | 0.00162 | 1.17 | zinc finger protein 593 | | ZNF593 | 1p36.11 | 51042 | |
| 1569283_at | 0.00615 | 1.17 | zinc finger protein 891 | | ZNF891 | 12q24.33 | 440122 | |
| 226453_at | 0.00022 | 1.17 | ribonuclease H2, subunit C | | RNASEH2C | 11q13.1 | 84153 | |
| 235044_at | 0.00122 | 1.17 | cysteine/tyrosine-rich 1 | | CYVR1 | 21q21.2 | 116159 | |
| 213826_s_at | 0.00454 | 1.17 | hypothetical LOC100133109 | | LOC100133109 | 2q31.1 | 100133109 | |
| 213194_at | 0.00032 | 1.16 | roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (<i>Drosophila</i>) | | ROBO1 | 3p12 | 6091 | |
| 201192_s_at | 0.00209 | 1.16 | phosphatidylinositol transfer protein, alpha | | PITPNA | 17p13.3 | 5306 | |
| 213454_at | 0.00035 | 1.16 | apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1 | | API1D1 | 1p36 1p36.22 | 1325 | |
| 213057_at | 0.00117 | 1.16 | ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2 | | ATPAF2 | 17p11.2 | 91647 | |
| 229940_at | 0.00564 | 1.16 | SET domain containing 3 | | SETD3 | 14q32.2 | 84193 | |
| 222763_s_at | 0.00998 | 1.16 | WD repeat domain 33 | | WDR33 | 2q14.3 | 55339 | |
| 222801_s_at | 0.00006 | 1.16 | stromal antigen 3-like 4 | | STAG3L4 | 7p11.2-q11.2 | 64940 | |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|--|---------------|-----------------|--------|
| 228020_at | 0.00097 | 1.16 | pentatricopeptide repeat domain 3 | PTCD3 | 2p11.2 | 55037 |
| 239132_at | 0.00258 | 1.16 | nitric oxide synthase 1 (neuronal) | NOS1 | 12q24.2-q24.31 | 4842 |
| 202068_s_at | 0.00259 | 1.16 | low density lipoprotein receptor | LDLR | 19p13.2 | 3949 |
| 231897_at | 0.00369 | 1.16 | prostaglandin reductase 1 | PTGR1 | 9q31.3 | 22949 |
| 203124_s_at | 0.00995 | 1.16 | solute carrier family 11 | SLC11A2 | 12q13 | 4891 |
| 208952_s_at | 0.00016 | 1.16 | La ribonucleoprotein domain family, member 4B | LARP4B | 10p15.3 | 23185 |
| 242981_at | 0.00080 | 1.16 | cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5 | CYP3A5 | 7q21.1 | 1577 |
| 1559654_s_at | 0.00309 | 1.16 | clone IMAGE:5229134 | | | |
| 227061_at | 0.00923 | 1.16 | cDNA FLJ44429 fi | | | |
| 209600_s_at | 0.00152 | 1.16 | acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl | ACOX1 | q25 17q25.1 | 51 |
| 201728_s_at | 0.00197 | 1.16 | KIAA0100 | KIAA0100 | 17q11.2 | 9703 |
| 238579_at | 0.00136 | 1.16 | chromosome 9 open reading frame 85 | C9orf85 | 9q21.13 | 138241 |
| 224397_s_at | 0.00195 | 1.16 | transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1 | TMTC1 | 12p11.22 | 83857 |
| 242429_at | 0.00473 | 1.16 | zinc finger protein 567 | ZNF567 | 19q13.12 | 163081 |
| 227896_at | 0.00709 | 1.16 | BRCA2 and CDKN1A interacting protein | BCCIP | 10q26.1 | 56647 |
| 222449_at | 0.00980 | 1.16 | prostate transmembrane protein, androgen induced 1 | PMEPA1 | 20q13.31-q13.33 | 56937 |
| 219891_at | 0.00033 | 1.16 | pyroglutamyl-peptidase I | PGPEP1 | 19p13.11 | 54858 |
| 236012_at | 0.00114 | 1.16 | proteasome (prosome, macropain) inhibitor subunit 1 (P131) | PSMF1 | 20p13 | 9491 |
| 1553960_at | 0.00166 | 1.16 | sorting nexin family member 21 | SNX21 | 20q13.12 | 90203 |
| 203465_at | 0.00177 | 1.16 | mitochondrial ribosomal protein L19 | MIRP19 | 2q11.1-q11.2 | 9801 |
| 235182_at | 0.00385 | 1.16 | isthmin 1 homolog (zebrafish) | ISM1 | 20p12.1 | 140862 |
| 207633_s_at | 0.00488 | 1.16 | muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase | MUSK | 9q31.3-q32 | 4593 |
| 243579_at | 0.00133 | 1.16 | musashi homolog 2 (Drosophila) | MSI2 | 17q22 | 124540 |
| 224210_s_at | 0.00161 | 1.16 | peroxisomal membrane protein 4, 24kDa | PXMP4 | 20q11.22 | 11264 |
| 235489_at | 0.00435 | 1.16 | ras homolog family member J | RHOJ | 14q23.2 | 57381 |
| 218410_s_at | 0.00562 | 1.16 | phosphoglycolate phosphatase | PGP | 16p13.3 | 283871 |
| 210793_s_at | 0.00855 | 1.16 | nucleoporin 98kDa | NUP98 | 11p15.5 | 4928 |
| 1553991_s_at | 0.00905 | 1.16 | V-set and immunoglobulin domain containing 10 | VSIG10 | 12q24.23 | 54621 |
| 222653_at | 0.00100 | 1.15 | pyridoxamine 5'-phosphate oxidase | PNPO | 17q21.32 | 55163 |
| 230115_at | 0.00147 | 1.15 | uncharacterized DKFZp779M0652 | DKFZp779M0652 | 11p11.2 | 374387 |

| | | | | | | |
|-------------|---------|------|---|------------------|--------------|--------|
| 219654_at | 0.00187 | 1.15 | protein tyrosine phosphatase-like, member A | PTPLA | 10p14-p13 | 9200 |
| 208629_s_at | 0.00200 | 1.15 | hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, alpha subunit | HADHA | 2p23 | 3030 |
| 205809_s_at | 0.00586 | 1.15 | Wiskott-Aldrich syndrome-like | WASL | 7q31.3 | 8976 |
| 202399_s_at | 0.00007 | 1.15 | adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit | AP3S2 | 15q26.1 | 10239 |
| 229535_at | 0.00056 | 1.15 | protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1 | PTPMT1 | 11p11.2 | 114971 |
| 218018_at | 0.00245 | 1.15 | pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) kinase | PDXK | 21q22.3 | 8566 |
| 227967_at | 0.00338 | 1.15 | tubulin, gamma complex associated protein 5 | TUBGCP5 | 15q11.2 | 114791 |
| 230724_s_at | 0.00044 | 1.15 | chromosome 11 open reading frame 57 | C11orf57 | 11q23.1 | 55216 |
| 220072_at | 0.00119 | 1.15 | centrosome and spindle pole associated protein 1 | CSPP1 | 8q13.2 | 79848 |
| 229954_at | 0.00143 | 1.15 | choline dehydrogenase | CHDH | 3p21.1 | 55349 |
| 203325_s_at | 0.00348 | 1.15 | collagen, type V, alpha 1 | COL5A1 | 9q34.2-q34.3 | 1289 |
| 204665_at | 0.00516 | 1.15 | suppressor of IKBKE 1 | SIKE1 | 1p13.2 | 80143 |
| 204305_at | 0.00027 | 1.15 | mitochondrial intermediate peptidase | MIIPEP | 13q12 | 4285 |
| 210330_at | 0.00089 | 1.15 | sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein) | SGCD | 5q33-q34 | 6444 |
| 219048_at | 0.00119 | 1.15 | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class N | PIGN | 18q21.33 | 23556 |
| 226786_at | 0.00121 | 1.15 | regulatory factor X, 1 (influences HLA class II expression) | RFX1 | 19p13.1 | 5989 |
| 224444_s_at | 0.00291 | 1.15 | long intergenic non-protein coding RNA 467 | LINC00467 | 1q32.3 | 84791 |
| 209047_at | 0.00319 | 1.15 | aquaporin 1 (Colton blood group) | AQP1 | 7p14 | 358 |
| 242939_at | 0.00377 | 1.15 | transcription factor Dp-1 | TFDP1 | 13q34 | 7027 |
| 236526_x_at | 0.00617 | 1.15 | chromosome 5 open reading frame 44 | C5orf44 | 5q12.3 | 80006 |
| 224448_s_at | 0.00044 | 1.15 | mitochondrial nucleoid factor 1 | MNF1 | 6p21.31 | 84300 |
| 229647_at | 0.00047 | 1.15 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 1, 75kDa | NDUFS1 | 2q33-q34 | 4719 |
| 209122_at | 0.00360 | 1.15 | perilipin 2 | PLIN2 | 9p22.1 | 123 |
| 232283_at | 0.00162 | 1.15 | LysM, putative peptidoglycan-binding, domain containing 1 | LYSMD1 | 1q21.3 | 388695 |
| 218789_s_at | 0.00195 | 1.15 | chromosome 11 open reading frame 71 | C11orf71 | 11q23.2 | 54494 |
| 225499_at | 0.00392 | 1.15 | Ral GTPase activating protein, alpha subunit 2 (catalytic) | RALGAPA2 | 20p11.22 | 57186 |
| 211355_x_at | 0.00686 | 1.15 | leptin receptor | LEPR | 1p31 | 3953 |
| 222258_s_at | 0.00789 | 1.15 | SH3-domain binding protein 4 | SH3BP4 | 2q37.1-q37.2 | 23677 |
| 204839_at | 0.00026 | 1.15 | processing of precursor 5, ribonuclease P/MRP subunit (S. cerevisiae) | POPS | 12q24.31 | 51367 |
| 238515_at | 0.00171 | 1.15 | nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 16 | NUDT16 | 3q22.1 | 131870 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|--|------------------|--------------|--------|
| 213350_at | 0.00177 | 1.15 | ribosomal protein S11 | RPS11 | 19q13.3 | 6205 |
| 212771_at | 0.00299 | 1.15 | family with sequence similarity 171, member A1 | FAM171A1 | 10p13 | 221061 |
| 206927_s_at | 0.00693 | 1.15 | guanylate cyclase 1, soluble, alpha 2 | GUCY1A2 | 11q21-q22 | 2977 |
| 205391_x_at | 0.00859 | 1.15 | ankyrin 1, erythrocytic | ANK1 | 8p11.1 | 286 |
| 221620_s_at | 0.00044 | 1.15 | apolipoprotein O | APOO | Xp22.11 | 79135 |
| 205530_at | 0.00212 | 1.15 | electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase | ETFDH | 4q32-q35 | 2110 |
| 202754_at | 0.00321 | 1.15 | R3H domain containing 1 | R3HDM1 | 2q21.3 | 23518 |
| 241433_at | 0.00325 | 1.15 | REST corepressor 3 | RCOR3 | 1q32.2 | 55758 |
| 243539_at | 0.00368 | 1.15 | KIAA1841 | KIAA1841 | 2q14 | 84542 |
| 214492_at | 0.00631 | 1.15 | sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein) | SGCD | 5q33-q34 | 6444 |
| 214889_at | 0.00643 | 1.15 | family with sequence similarity 149, member A | FAM149A | 4q35.1 | 25854 |
| 208352_x_at | 0.00851 | 1.15 | ankyrin 1, erythrocytic | ANK1 | 8p11.1 | 286 |
| 228412_at | 0.00212 | 1.15 | uncharacterized LOC643072 | LOC643072 | 2q24.2 | 643072 |
| 202252_at | 0.00217 | 1.15 | RAB13, member RAS oncogene family | RAB13 | 1q21.2 | 5872 |
| 233461_x_at | 0.00812 | 1.15 | zinc finger protein 226 | ZNF226 | 19q13.2 | 7769 |
| 204572_s_at | 0.00919 | 1.15 | protein (peptidylprolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting, 4 | PIN4 | Xq13 | 5303 |
| 225751_at | 0.00139 | 1.14 | RNA binding motif protein 17 | RBM17 | 10p15.1 | 84991 |
| 1563796_s_at | 0.00436 | 1.14 | glutamyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative) | EAR52 | 16p12.2 | 124454 |
| 228790_at | 0.00208 | 1.14 | family with sequence similarity 110, member B | FAM110B | 8q12.1 | 90362 |
| 232412_at | 0.00429 | 1.14 | F-box and leucine-rich repeat protein 20 | FBXL20 | 17q12 | 84961 |
| 210219_at | 0.00461 | 1.14 | SP100 nuclear antigen | SP100 | 2q37.1 | 6672 |
| 220663_at | 0.00488 | 1.14 | interleukin 1 receptor accessory protein-like 1 | IL1RAPL1 | Xp22.1-p21.3 | 11141 |
| 226919_at | 0.00986 | 1.14 | LYR motif containing 2 | LYRM2 | 6q15 | 57226 |
| 225427_s_at | 0.00025 | 1.14 | apolipoprotein A-I binding protein | APOA1BP | 1q21 | 128240 |
| 218760_at | 0.00032 | 1.14 | coenzyme Q6 homolog, monooxygenase (<i>S. cerevisiae</i>) | COQ6 | 14q24.3 | 51004 |
| 224625_x_at | 0.00267 | 1.14 | small EDRK-rich factor 2 | SERF2 | 15q15.3 | 10169 |
| 238767_at | 0.00584 | 1.14 | chromosome 4 open reading frame 36 | C4orf36 | 4q21.3 | 132989 |
| 232218_at | 0.00631 | 1.14 | TruB pseudouridine (psi) synthase homolog 2 (<i>E. coli</i>) | truB2 | 9q34.11 | 26995 |
| 213155_at | 0.00768 | 1.14 | WSC domain containing 1 | WSCD1 | 17p13.2 | 23302 |
| 210752_s_at | 0.00272 | 1.14 | MAX-like protein X | MLX | 17q21.1 | 6945 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|------------------|---------------|--------|
| 227291_s_at | 0.00056 | 1.14 | bola homolog 3 (E. coli) | BOLA3 | 2p13.1 | 388962 |
| 218435_at | 0.00059 | 1.14 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15 | DNAJC15 | 13q14.1 | 29103 |
| 243815_at | 0.00158 | 1.14 | piggyBac transposable element derived 4 | PGBD4 | 15q14 | 161779 |
| 213342_at | 0.00404 | 1.14 | Yes-associated protein 1 | YAP1 | 11q13 | 10413 |
| 236772_s_at | 0.00662 | 1.14 | clone IMAGE:1029231 | | | |
| 212222_at | 0.00667 | 1.14 | proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4 | PSME4 | 2p16.2 | 23198 |
| 1555292_at | 0.00921 | 1.14 | family with sequence similarity 40, member B | FAM40B | 7q32.1 | 57464 |
| 225472_at | 0.00082 | 1.14 | G patch domain and ankyrin repeats 1 | GPANK1 | 6p21.3 | 7918 |
| 204067_at | 0.00121 | 1.14 | sulfite oxidase | SUOX | 12q13.2 | 6821 |
| 222056_s_at | 0.00250 | 1.14 | fumarylacetate hydrolase domain containing 2A | FAHD2A | 2p24.3-p11.2 | 51011 |
| 235757_at | 0.00884 | 1.14 | chromosome 10 open reading frame 18 | C10orf18 | 10p15.1 | 54906 |
| 243129_at | 0.00164 | 1.14 | hypothetical LOC642980 | LOC642980 | | 642980 |
| 216716_at | 0.00624 | 1.14 | ABO blood group | ABO | 9q34.2 | 28 |
| 1560135_at | 0.00636 | 1.14 | laminin, alpha 2 | LAMA2 | 6q22-q23 | 3908 |
| 212957_s_at | 0.00771 | 1.14 | uncharacterized LOC92249 | LOC92249 | Xq11.1 | 92249 |
| 227582_at | 0.00848 | 1.14 | kelch domain containing 9 | KLHDC9 | 1q23.3 | 126823 |
| 240415_at | 0.00980 | 1.14 | interferon regulatory factor 2 | IRF2 | 4q34.1-q35.1 | 3660 |
| 238692_at | 0.00028 | 1.14 | BTB (POZ) domain containing 11 | BTBD11 | 12q23.3 | 121551 |
| 226151_x_at | 0.00052 | 1.14 | crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1 | CRYZL1 | 21q21.3 | 9946 |
| 212952_at | 0.00059 | 1.14 | calreticulin | CALR | 19p13.3-p13.2 | 811 |
| 238087_at | 0.00079 | 1.14 | RNA 3'-terminal phosphate cyclase | RTCA | 1p21.2 | 8634 |
| 1558430_at | 0.00232 | 1.14 | pyridoxal-dependent decarboxylase domain containing 1 | PDXDC1 | 16p13.11 | 23042 |
| 223551_at | 0.00746 | 1.14 | protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta | PKIB | 6q22.31 | 5570 |
| 224869_s_at | 0.00038 | 1.14 | mitochondrial ribosomal protein S25 | MRRPS25 | 3p25 | 64432 |
| 203040_s_at | 0.00085 | 1.14 | hydroxymethylbilane synthase | HIMBS | 11q23.3 | 3145 |
| 229452_at | 0.00112 | 1.14 | transmembrane protein 88 | TMEM88 | 17p13.1 | 92162 |
| 226485_at | 0.00135 | 1.14 | V-set and immunoglobulin domain containing 10 | VSIG10 | 12q24.23 | 54621 |
| 200622_x_at | 0.00231 | 1.14 | calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta) | CALM1 | 14q24-q31 | 801 |
| 1557165_s_at | 0.00346 | 1.14 | kelch-like 18 (Drosophila) | KLHL18 | 3p21.31 | 23276 |
| 231588_at | 0.00433 | 1.14 | prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C) | PRCP | 11q14 | 5547 |

| | | | | | | |
|----------------|---------|------|---|-----------------|--------------|-----------|
| 239739_at | 0.00456 | 1.14 | sorting nexin 24 | SNX24 | 5q23.2 | 28966 |
| 238860_at | 0.00636 | 1.14 | chromosome 6 open reading frame 130 | C6orf130 | 6p21.1 | 221443 |
| 203833_s_at | 0.00700 | 1.14 | trans-golgi network protein 2 | TGOLN2 | 2p11.2 | 10618 |
| 235034_at | 0.00961 | 1.14 | vesicle transport through interaction with t-SNAREs homolog 1A | VT11A | 10q25.2 | 143187 |
| 231640_at | 0.00966 | 1.14 | v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog | KRAS | 12p12.1 | 3845 |
| 226833_at | 0.00163 | 1.14 | cytochrome b5 domain containing 1 | CYB5D1 | 17p13.1 | 124637 |
| 229826_at | 0.00347 | 1.14 | chromosome 3 open reading frame 78 | C3orf78 | 3p21.1 | 440957 |
| 227960_s_at | 0.00718 | 1.14 | fumarylacetoacetate hydrolase domain containing 1 | FAHD1 | 16p13.3 | 81889 |
| 1552611_a_at | 0.00943 | 1.14 | Janus kinase 1 | JAK1 | 1p32.3-p31.3 | 3716 |
| 227822_at | 0.00050 | 1.13 | zinc finger protein 605 | ZNF605 | 12q24.33 | 90462 |
| 236938_at | 0.00257 | 1.13 | clone IMAGE:471181 | | | |
| 229444_at | 0.00267 | 1.13 | chromosome 6 open reading frame 106 | C6orf106 | 6p21.31 | 64771 |
| 204824_at | 0.00610 | 1.13 | endonuclease G | ENDOG | 9q34.1 | 2021 |
| 217499_x_at | 0.00858 | 1.13 | olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 37 pseudogene | OR7E37P | 13 | 100506759 |
| 210563_x_at | 0.00884 | 1.13 | CASP8 and FADD-like apoptosis regulator | CFLAR | 2q33-q34 | 8837 |
| 231786_at | 0.00916 | 1.13 | homeobox A13 | HOXA13 | 7p15.2 | 3209 |
| 226611_s_at | 0.00184 | 1.13 | centromere protein V | CENPV | 17p11.2 | 201161 |
| 1555906_s_s_at | 0.00236 | 1.13 | chromosome 3 open reading frame 23 | C3orf23 | 3p21.31 | 285343 |
| 202403_s_at | 0.00341 | 1.13 | collagen, type I, alpha 2 | COL1A2 | 7q22.1 | 1278 |
| 219647_at | 0.00752 | 1.13 | popeye domain containing 2 | POPC2 | 3q13.33 | 64091 |
| 202283_at | 0.00221 | 1.13 | serpin peptidase inhibitor, clade F, member 1 | SERPINF1 | 17p13.1 | 5176 |
| 230156_x_at | 0.00306 | 1.13 | chromodomain helicase DNA binding protein 2 | CHD2 | 15q26 | 1106 |
| 227962_at | 0.00362 | 1.13 | acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl | ACOX1 | q25 17q25.1 | 51 |
| 219706_at | 0.00489 | 1.13 | adaptor-related protein complex 5, sigma 1 subunit | AP5S1 | 20p13 | 55317 |
| 236629_at | 0.00749 | 1.13 | IBA57, iron-sulfur cluster assembly homolog (S. cerevisiae) | IBA57 | | 200205 |
| 224921_at | 0.00814 | 1.13 | secretory carrier membrane protein 2 | SCAMP2 | 15q23-q25 | 10066 |
| 219507_at | 0.00055 | 1.13 | arginine/serine-rich coiled-coil 1 | RSRC1 | 3q25.32 | 51319 |
| 225943_at | 0.00287 | 1.13 | neurolysin (metallopeptidase M3 family) | NLN | 5q12.3 | 57486 |
| 215918_s_at | 0.00326 | 1.13 | spectrin, beta, non-erythrocytic 1 | SPTBN1 | | 6711 |
| 230581_at | 0.00775 | 1.13 | clone IMAGE:2308190 | | | |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|--|-----------------|-------------|--------|
| 219870_at | 0.00080 | 1.13 | activating transcription factor 7 interacting protein 2 | ATF7IP2 | 16p13.13 | 80063 |
| 1568934_at | 0.00409 | 1.13 | chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 | CX3CR1 | 3p21 3p21.3 | 1524 |
| 209233_at | 0.00666 | 1.13 | EMG1 nucleolar protein homolog (<i>S. cerevisiae</i>) | EMG1 | 12p13.3 | 10436 |
| 244520_at | 0.00685 | 1.13 | clone IMAGE:2722526 | | | |
| 205148_s_at | 0.00734 | 1.13 | chloride channel 4 | CLCN4 | Xp22.3 | 1183 |
| 211354_s_at | 0.00887 | 1.13 | leptin receptor | LEPR | 1p31 | 3953 |
| 221562_s_at | 0.00694 | 1.13 | sirtuin 3 (<i>S. cerevisiae</i>) | SIRT3 | 11p15.5 | 23410 |
| 230685_at | 0.00771 | 1.13 | uncharacterized LOC644873 | FLJ33630 | 5q23.3 | 644873 |
| 235977_at | 0.00982 | 1.13 | LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2 | LONRF2 | 2q11.2 | 164832 |
| 215394_at | 0.00197 | 1.13 | phosphoinositide-3-kinase, class 3 | PIK3C3 | 18q12.3 | 5289 |
| 225016_at | 0.00497 | 1.13 | adenomatosis polyposis coli down-regulated 1 | APCDD1 | 18p11.22 | 147495 |
| 203672_x_at | 0.00749 | 1.13 | thiopurine S-methyltransferase | TPMT | 6p22.3 | 7172 |
| 244433_at | 0.00794 | 1.13 | clone IMAGE:2471380 | | | |
| 234936_s_at | 0.00272 | 1.13 | coiled-coil and C2 domain containing 2A | CC2D2A | 4p15.32 | 57545 |
| 1555679_a_at | 0.00378 | 1.13 | reticulon 4 interacting protein 1 | RTN4IP1 | 6q21 | 84816 |
| 1554085_at | 0.00430 | 1.13 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 51 | DDX51 | 12q24.33 | 317781 |
| 1557950_at | 0.00438 | 1.13 | nuclear export mediator factor | NEMF | 14q22 | 9147 |
| 219873_at | 0.00937 | 1.13 | collectin sub-family member 11 | COLEC11 | 2p25.3 | 78989 |
| 219680_at | 0.00070 | 1.13 | NLR family member X1 | NLRX1 | 11q23.3 | 79671 |
| 225826_at | 0.00190 | 1.13 | methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblB type | MMAB | 12q24 | 326625 |
| 1555777_at | 0.00367 | 1.13 | periostin, osteoblast specific factor | POSTN | 13q13.3 | 10631 |
| 212556_at | 0.00451 | 1.13 | scribbled homolog (<i>Drosophila</i>) | SCRIB | 8q24.3 | 23513 |
| 208054_at | 0.00474 | 1.13 | HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4 | HERC4 | 10q21.3 | 26091 |
| 202053_s_at | 0.00510 | 1.13 | aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2 | ALDH3A2 | 17p11.2 | 224 |
| 1555997_s_at | 0.00695 | 1.13 | insulin-like growth factor binding protein 5 | IGFBP5 | 2q33-q36 | 3488 |
| 241689_at | 0.00939 | 1.13 | clone IMAGE:1371143 | | | |
| 205608_s_at | 0.00951 | 1.13 | angiotensin 1 | ANGPT1 | 8q23.1 | 284 |
| 212694_s_at | 0.00030 | 1.13 | propionyl CoA carboxylase, beta polypeptide | PCCB | 3q21-q22 | 5096 |
| 207044_at | 0.00081 | 1.13 | thyroid hormone receptor, beta | THRB | 3p24.2 | 7068 |
| 209623_at | 0.00460 | 1.13 | methylcrotonoyl-CoA carboxylase 2 (beta) | MCCC2 | 5q12-q13 | 64087 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|-----------------|-----------------|--------|
| 205856_at | 0.00891 | 1.13 | solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 | SLC14A1 | 18q11-q12 | 6563 |
| 203225_s_at | 0.00934 | 1.13 | riboflavin kinase | RFK | 9q21.13 | 55312 |
| 222105_s_at | 0.00092 | 1.12 | NFKB inhibitor interacting Ras-like 2 | NKIRAS2 | 17q21.2 | 28511 |
| 212146_at | 0.00095 | 1.12 | pleckstrin homology domain containing, family M, member 2 | PLEKHM2 | 1p36.21 | 23207 |
| 239288_at | 0.00339 | 1.12 | TRAF2 and NCK interacting kinase | TNIK | 3q26.31 | 23043 |
| 1568658_at | 0.00445 | 1.12 | chromosome 2 open reading frame 74 | C2orf74 | 2p15 | 339804 |
| 240911_at | 0.00723 | 1.12 | nitric oxide synthase 1 (neuronal) | NOS1 | 12q24.2-q24.31 | 4842 |
| 228765_at | 0.00044 | 1.12 | GTF2I repeat domain containing 2 | GTF2IRD2 | 7q11.23 | 84163 |
| 219113_x_at | 0.00053 | 1.12 | hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14 | HSD17B14 | 19q13.33 | 51171 |
| 1553690_at | 0.00163 | 1.12 | shugoshin-like 1 (S. pombe) | SGOL1 | 3p24.3 | 151648 |
| 232092_at | 0.00260 | 1.12 | solute carrier family 25, member 51 | SLC25A51 | 9p13.3-p12 | 92014 |
| 235389_at | 0.00261 | 1.12 | PHD finger protein 20 | PHF20 | 20q11.22-q11.23 | 51230 |
| 238448_at | 0.00325 | 1.12 | mitochondrial ribosomal protein L19 | MRPL19 | 2q11.1-q11.2 | 9801 |
| 209508_x_at | 0.00552 | 1.12 | CASP8 and FADD-like apoptosis regulator | CFLAR | 2q33-q34 | 8837 |
| 235193_at | 0.00687 | 1.12 | KIAA1370 | KIAA1370 | 15q21.2-q21.3 | 56204 |
| 226745_at | 0.00969 | 1.12 | cytochrome P450, family 4, subfamily V, polypeptide 2 | CYP4V2 | 4q35.2 | 285440 |
| 219431_at | 0.00124 | 1.12 | Rho GTPase activating protein 10 | ARHGAP10 | 4q31.23 | 79658 |
| 218153_at | 0.00169 | 1.12 | cysteinyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative) | CARS2 | 13q34 | 79587 |
| 229573_at | 0.00170 | 1.12 | ubiquitin specific peptidase 9, X-linked | USP9X | Xp11.4 | 8239 |
| 202253_s_at | 0.00371 | 1.12 | dynamitin 2 | DNM2 | 19p13.2 | 1785 |
| 210183_x_at | 0.00422 | 1.12 | pinin, desmosome associated protein | PNN | 14q21.1 | 5411 |
| 222315_at | 0.00429 | 1.12 | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15 | KCNJ15 | 21q22.2 | 3772 |
| 219076_s_at | 0.00110 | 1.12 | peroxisomal membrane protein 2, 22kDa | PXMP2 | 12q24.33 | 5827 |
| 230528_s_at | 0.00308 | 1.12 | CENPB DNA-binding domains containing 1 pseudogene | MGC2752 | 19q13.43 | 65996 |
| 208758_at | 0.00386 | 1.12 | formyltransferase/IMP cyclohydrolase | ATIC | 2q35 | 471 |
| 223442_at | 0.00329 | 1.12 | nicotin 1 | NICN1 | 3p21.31 | 84276 |
| 210849_s_at | 0.00463 | 1.12 | vacuolar protein sorting 41 homolog (S. cerevisiae) | VPS41 | 7p14-p13 | 27072 |
| 1554906_a_at | 0.00595 | 1.12 | M-phase phosphoprotein 6 | MPHOSPH6 | 16q23.3 | 10200 |
| 224877_s_at | 0.00994 | 1.12 | mitochondrial ribosomal protein S5 | MRRP5 | 2p11.2-q11.2 | 64969 |
| 225790_at | 0.00140 | 1.12 | methionine sulfoxide reductase B3 | MRSB3 | 12q14.3 | 253827 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|-----------|---------------|--------|
| 220058_at | 0.00259 | 1.12 | chromosome 17 open reading frame 39 | C17orf39 | 17p11.2 | 79018 |
| 229822_at | 0.00334 | 1.12 | parvin, gamma | PARVG | 22q13.31 | 64098 |
| 1564002_a_at | 0.00455 | 1.12 | adenylate kinase domain containing 1 | AKD1 | 6q21 | 221264 |
| 240365_at | 0.00488 | 1.12 | uncharacterized LOC647946 | LOC647946 | 18q12.2-q12.3 | 647946 |
| 223138_s_at | 0.00524 | 1.12 | DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36 | DHX36 | 3p13-q23 | 170506 |
| 220295_x_at | 0.00615 | 1.12 | DEP domain containing 1 | DEPDC1 | 1p31.2 | 55635 |
| 220905_at | 0.00689 | 1.12 | cdNA FLJ13501 fis | ENOX2 | Xq25 | 10495 |
| 234003_at | 0.00726 | 1.12 | ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 2 | MCTS1 | Xq24 | 28985 |
| 218163_at | 0.00086 | 1.12 | malignant T cell amplified sequence 1 | MEGF8 | 19q12 | 1954 |
| 227327_at | 0.00274 | 1.12 | multiple EGF-like-domains 8 | DPP3 | 11q12-q13.1 | 10072 |
| 218567_x_at | 0.00427 | 1.12 | dipeptidyl-peptidase 3 | ANK1 | 8p11.1 | 286 |
| 205389_s_at | 0.00445 | 1.12 | ankyrin 1, erythrocytic | NTHL1 | 16p13.3 | 4913 |
| 209731_at | 0.00446 | 1.12 | nth endonuclease III-like 1 (E. coli) | RBK5 | 2p23.3 | 64080 |
| 57540_at | 0.00337 | 1.12 | ribokinase | DTNA | 18q12 | 1837 |
| 205741_s_at | 0.00197 | 1.12 | dystrobrevin, alpha | EXOSC1 | 10q24 | 51013 |
| 222609_s_at | 0.00262 | 1.12 | exosome component 1 | UBE3B | 12q24.11 | 89910 |
| 212403_at | 0.00330 | 1.12 | ubiquitin protein ligase E3B | C6orf108 | 6p21.1 | 10591 |
| 39817_s_at | 0.00516 | 1.12 | chromosome 6 open reading frame 108 | ZKSCAN4 | 6p21 | 387032 |
| 213625_at | 0.00539 | 1.12 | zinc finger with KRAB and SCAN domains 4 | GN5 | 1p22 | 2787 |
| 207157_s_at | 0.00588 | 1.12 | guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5 | UCLH3 | 13q22.2 | 7347 |
| 204616_at | 0.00177 | 1.12 | ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase) | SOX6 | 11p15.3 | 55553 |
| 227497_at | 0.00189 | 1.12 | SRV (sex determining region Y)-box 6 | GPATCH4 | 1q22 | 54865 |
| 220596_at | 0.00298 | 1.12 | G patch domain containing 4 | OTUD7B | 1q21.2 | 56957 |
| 227436_at | 0.00419 | 1.12 | OTU domain containing 7B | IFITD1 | 12p12.1 | 160492 |
| 1552865_a_at | 0.00473 | 1.12 | intermediate filament tail domain containing 1 | FEM1A | 19p13.3 | 55527 |
| 228435_at | 0.00647 | 1.12 | fem-1 homolog a (C. elegans) | APPPB2 | 17q21-q23 | 10513 |
| 202631_s_at | 0.00858 | 1.12 | amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2 | EXOSC2 | 9q34 | 23404 |
| 209527_at | 0.00931 | 1.12 | exosome component 2 | PPP1R26 | 9q34.3 | 9858 |
| 203955_at | 0.00973 | 1.12 | protein phosphatase 1, regulatory subunit 26 | TNPO1 | 5q13.2 | 3842 |
| 209225_x_at | 0.00100 | 1.11 | transportin 1 | | | |

| | | | | | | |
|-------------|---------|------|--|--------------|----------------|-----------|
| 202740_at | 0.00228 | 1.11 | aminoacylase 1 | ACV1 | 3p21.1 | 95 |
| 223461_at | 0.00298 | 1.11 | TBC1 domain family, member 7 | TBC1D7 | 6p24.1 | 51256 |
| 226433_at | 0.00367 | 1.11 | ring finger protein 157 | RNF157 | 17q25.1 | 114804 |
| 200793_s_at | 0.00529 | 1.11 | aconitase 2, mitochondrial | AC02 | q13.31 22q13.2 | 50 |
| 223677_at | 0.00555 | 1.11 | autophagy related 10 | ATG10 | 5q14.1 | 83734 |
| 219931_s_at | 0.00614 | 1.11 | kelch-like 12 (Drosophila) | KLHL12 | 1q32.1 | 59349 |
| 207347_at | 0.00641 | 1.11 | excision repair cross-complementing rodent repair deficiency | ERCC6 | 10q11.23 | 2074 |
| 208785_s_at | 0.00645 | 1.11 | microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta | MAP1LC3B | 16q24.2 | 81631 |
| 226943_at | 0.00684 | 1.11 | chromosome 12 open reading frame 73 | C12orf73 | 12q23.3 | 728568 |
| 228970_at | 0.00108 | 1.11 | zinc finger and BTB domain containing 8 opposite strand | ZBTB80S | 1p35.1 | 339487 |
| 209836_x_at | 0.00182 | 1.11 | bolA homolog 2 (E. coli) | BOLA2 | 16p11.2 | 552900 |
| 237244_at | 0.00216 | 1.11 | uncharacterized LOC100506769 | LOC100506769 | | 100506769 |
| 213062_at | 0.00271 | 1.11 | N-terminal asparagine amidase | NTAN1 | 16p13.11 | 123803 |
| 205441_at | 0.00302 | 1.11 | occludin/ELL domain containing 1 | OCEL1 | 19p13.11 | 79629 |
| 223721_s_at | 0.00380 | 1.11 | Dnal (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12 | DNALC12 | 10q22.1 | 56521 |
| 201826_s_at | 0.00560 | 1.11 | saccharopine dehydrogenase (putative) | SCCPDH | 1q44 | 51097 |
| 218624_s_at | 0.00623 | 1.11 | CENPB DNA-binding domains containing 1 pseudogene | MGC2752 | 19q13.43 | 65996 |
| 224904_at | 0.00676 | 1.11 | pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit | PDPB | 16q22.1 | 55066 |
| 231880_at | 0.00701 | 1.11 | family with sequence similarity 40, member B | FAM40B | 7q32.1 | 57464 |
| 225555_x_at | 0.00757 | 1.11 | aurora kinase A interacting protein 1 | AURKAIP1 | 1p36.33 | 54998 |
| 213322_at | 0.00970 | 1.11 | chromosome 6 open reading frame 130 | C6orf130 | 6p21.1 | 221443 |
| 225568_at | 0.00331 | 1.11 | transmembrane protein 141 | TMEM141 | 9q34.3 | 85014 |
| 212922_s_at | 0.00356 | 1.11 | SET and MYND domain containing 2 | SMYD2 | 1q32.3 | 56950 |
| 209123_at | 0.00362 | 1.11 | quinoid dihydropteridine reductase | QDPR | 4p15.31 | 5860 |
| 222573_s_at | 0.00598 | 1.11 | salvador homolog 1 (Drosophila) | SAV1 | 14q13-q23 | 60485 |
| 203762_s_at | 0.00607 | 1.11 | dynein, cytoplasmic 2, light intermediate chain 1 | DYNC2L1 | 2p25.1-p24.1 | 51626 |
| 203255_at | 0.00821 | 1.11 | F-box protein 11 | FBXO11 | 2p16.3 | 80204 |
| 235040_at | 0.00829 | 1.11 | RUN domain containing 1 | RUNDC1 | 17q21.31 | 146923 |
| 209793_at | 0.00884 | 1.11 | glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1 | GRIA1 | 5q33 5q31.1 | 2890 |
| 229663_at | 0.00185 | 1.11 | ion peptidase 2, peroxisomal | LONP2 | 16q12.1 | 83752 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|-----------|---------------|--------|
| 225697_at | 0.00229 | 1.11 | cyclin-dependent kinase 12 | CDK12 | 17q12 | 51755 |
| 223448_x_at | 0.00323 | 1.11 | mitochondrial ribosomal protein S22 | MRPS22 | 3q23 | 56945 |
| 1568592_at | 0.00372 | 1.11 | tripartite motif containing 69 | TRIM69 | 15q21.1 | 140691 |
| 223266_at | 0.00533 | 1.11 | STE20-related kinase adaptor beta | STRADB | 2q33.1 | 55437 |
| 225755_at | 0.00571 | 1.11 | kelch domain containing 8B | KLHDC8B | 3p21.31 | 200942 |
| 228839_s_at | 0.00604 | 1.11 | uncharacterized LOC642361 | LOC642361 | 10q23.2 | 439994 |
| 227274_at | 0.00673 | 1.11 | synaptotagmin 2 binding protein | SYNJ2BP | 14q24.2 | 55333 |
| 233778_at | 0.00755 | 1.11 | deleted in a mouse model of primary ciliary dyskinesia | DPCD | 10q24.32 | 25911 |
| 236718_at | 0.00895 | 1.11 | myosin X | MYO10 | 5p15.1-p14.3 | 4651 |
| 214260_at | 0.00269 | 1.11 | COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 8 | COPS8 | 2q37.3 | 10920 |
| 226436_at | 0.00398 | 1.11 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 4 | RASSF4 | 10q11.21 | 83937 |
| 202818_s_at | 0.00525 | 1.11 | transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (elongin A) | TCEB3 | 1p36.1 | 6924 |
| 218102_at | 0.00562 | 1.11 | deoxyribose-phosphate aldolase (putative) | DERA | 12p12.3 | 51071 |
| 217963_s_at | 0.00797 | 1.11 | nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1 | NGFRAP1 | Xq22.2 | 27018 |
| 226212_s_at | 0.00995 | 1.11 | insulin receptor | INSR | 19p13.3-p13.2 | 3643 |
| 214306_at | 0.00480 | 1.11 | optic atrophy 1 (autosomal dominant) | OPA1 | 3q28-q29 | 4976 |
| 227448_at | 0.00516 | 1.11 | arginine and glutamate rich 1 | ARGLU1 | 13q33.3 | 55082 |
| 1554127_s_at | 0.00691 | 1.11 | methionine sulfoxide reductase B3 | MSRB3 | 12q14.3 | 253827 |
| 203912_s_at | 0.00726 | 1.11 | deoxyribonuclease I-like 1 | DNASE1L1 | Xq28 | 1774 |
| 217895_at | 0.00776 | 1.11 | pentatricopeptide repeat domain 3 | PTCD3 | 2p11.2 | 55037 |
| 225773_at | 0.00838 | 1.11 | ring finger and SPRY domain containing 1 | RSPRY1 | 16q13 | 89970 |
| 201284_s_at | 0.00840 | 1.11 | N-acylaminoacyl-peptide hydrolase | APEH | 3p21.31 | 327 |
| 226736_at | 0.00844 | 1.11 | churchill domain containing 1 | CHURC1 | 14q23.3 | 91612 |
| 224815_at | 0.00331 | 1.11 | COMM domain containing 7 | COMM7 | 20q11.21 | 149951 |
| 240331_at | 0.00372 | 1.11 | bone morphogenetic protein receptor, type 1B | BMPRI1B | 4q22-q24 | 658 |
| 207721_x_at | 0.00374 | 1.11 | histidine triad nucleotide binding protein 1 | HINT1 | 5q31.2 | 3094 |
| 203179_at | 0.00957 | 1.11 | galactose-1-phosphate uridylyltransferase | GALT | 9p13 | 2592 |
| 55662_at | 0.00436 | 1.11 | chromosome 10 open reading frame 76 | C10orf76 | 10q24.32 | 79591 |
| 222446_s_at | 0.00473 | 1.11 | beta-site APP-cleaving enzyme 2 | BACE2 | 21q22.3 | 25825 |
| 209739_s_at | 0.00509 | 1.11 | patatin-like phospholipase domain containing 4 | PNPLA4 | Xp22.3 | 8228 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|-----------|----------|--------|
| 223433_at | 0.00619 | 1.11 | Yae1 domain containing 1 | YAE1D1 | 7p14.1 | 57002 |
| 1553163_at | 0.00659 | 1.11 | ADP-ribosylhydrolase like 1 | ADPRHL1 | 13q34 | 113622 |
| 219253_at | 0.00699 | 1.11 | transmembrane protein 185B | TMEM185B | 2q14.2 | 79134 |
| 201537_s_at | 0.00773 | 1.11 | dual specificity phosphatase 3 | DUSP3 | 17q21 | 1845 |
| 218982_s_at | 0.00917 | 1.11 | mitochondrial ribosomal protein S17 | mrrps17 | 7p11 | 51373 |
| 218945_at | 0.00958 | 1.11 | methyltransferase like 22 | METTL22 | 16p13.2 | 79091 |
| 224824_at | 0.00990 | 1.11 | COX20 Cox2 chaperone homolog (S. cerevisiae) | COX20 | 1q44 | 116228 |
| 241670_x_at | 0.00709 | 1.11 | uncharacterized LOC729177 | LOC729177 | 6p22.3 | 729177 |
| 228397_at | 0.00891 | 1.11 | taurine upregulated 1 (non-protein coding) | TUG1 | 22q12.2 | 55000 |
| 203484_at | 0.00964 | 1.11 | Sec61 gamma subunit | SEC61G | 7p11.2 | 23480 |
| 230958_s_at | 0.00209 | 1.11 | glyceronephosphate O-acyltransferase | GNPAT | 1q42 | 8443 |
| 202571_s_at | 0.00405 | 1.11 | discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 4 | DLGAP4 | 20q11.23 | 22839 |
| 202487_s_at | 0.00412 | 1.11 | H2A histone family, member V | H2AFV | 7p13 | 94239 |
| 207904_s_at | 0.00761 | 1.11 | leucyl/cystinyl aminopeptidase | LNPEP | 5q15 | 4012 |
| 225314_at | 0.00800 | 1.11 | OClA domain containing 2 | OClAD2 | 4p11 | 132299 |
| 217973_at | 0.00162 | 1.10 | dicarboxyl/L-xylulose reductase | DCXR | 17q25.3 | 51181 |
| 221737_at | 0.00270 | 1.10 | guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12 | GNA12 | 7p22.2 | 2768 |
| 202103_at | 0.00711 | 1.10 | bromodomain containing 4 | BRD4 | 19p13.1 | 23476 |
| 227085_at | 0.00909 | 1.10 | H2A histone family, member V | H2AFV | 7p13 | 94239 |
| 220647_s_at | 0.00942 | 1.10 | coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 8 | CHCHD8 | 11q13.4 | 51287 |
| 212332_at | 0.00514 | 1.10 | retinoblastoma-like 2 (p130) | RBL2 | 16q12.2 | 5934 |
| 1554021_a_at | 0.00538 | 1.10 | zinc finger protein 12 | ZNF12 | 7q11-q22 | 5387 |
| 221511_x_at | 0.00891 | 1.10 | cell cycle progression 1 | CCPG1 | 15q21.1 | 9236 |
| 225403_at | 0.00981 | 1.10 | ribonuclease P/MRP 25kDa subunit-like | RPP25L | 9p13.3 | 138716 |
| 210778_s_at | 0.00993 | 1.10 | MAX dimerization protein 4 | MXD4 | 4p16.3 | 10608 |
| 223037_at | 0.00483 | 1.10 | PDZ domain containing 11 | PDZD11 | Xq13.1 | 51248 |
| 202217_at | 0.00530 | 1.10 | chromosome 21 open reading frame 33 | C21orf33 | 21q22.3 | 8209 |
| 212908_at | 0.00618 | 1.10 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 16 | DNAJC16 | 1p36.1 | 23341 |
| 235070_at | 0.00984 | 1.10 | RNA binding protein, fox-1 homolog (C. elegans) 1 | RBFOX1 | 16p13.3 | 54715 |
| 1555889_a_at | 0.00443 | 1.10 | cartilage associated protein | CRTAP | 3p22.3 | 10491 |

| | | | | | | |
|-------------|---------|------|---|----------|--------------|--------|
| 204576_s_at | 0.00500 | 1.10 | clusterin associated protein 1 | CUAP1 | 16p13.3 | 23059 |
| 225480_at | 0.00567 | 1.10 | chromosome 1 open reading frame 122 | C1orf122 | 1p34.3 | 127687 |
| 203578_s_at | 0.00571 | 1.10 | solute carrier family 7, member 6 | SLC7A6 | 16q22.1 | 9057 |
| 209256_s_at | 0.00749 | 1.10 | kelch domain containing 10 | KLHDC10 | 7q32.2 | 23008 |
| 229135_at | 0.00840 | 1.10 | FAST kinase domains 2 | FASTKD2 | 2q33.3 | 22868 |
| 206352_s_at | 0.00877 | 1.10 | peroxisomal biogenesis factor 10 | PEX10 | 1p36.32 | 5192 |
| 214170_x_at | 0.00289 | 1.10 | fumarate hydratase | FH | 1q42.1 | 2271 |
| 209507_at | 0.00430 | 1.10 | replication protein A3, 14kDa | RPA3 | 7p22 | 6119 |
| 217618_x_at | 0.00714 | 1.10 | HUS1 checkpoint homolog (S. pombe) | HUS1 | 7p13-p12 | 3364 |
| 226854_at | 0.00844 | 1.10 | GTP binding protein 5 (putative) | GTPBP5 | 20q13.33 | 26164 |
| 237563_s_at | 0.00984 | 1.10 | clone IMAGE:1855352 | | | |
| 208912_s_at | 0.00232 | 1.10 | 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase | CNP | 17q21 | 1267 |
| 214494_s_at | 0.00427 | 1.10 | spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive) | SPG7 | 16q24.3 | 6687 |
| 209445_x_at | 0.00917 | 1.10 | cytochrome c oxidase assembly factor 1 homolog (S. cerevisiae) | COA1 | 7p13 | 55744 |
| 209219_at | 0.00929 | 1.10 | RD RNA binding protein | RDBP | 6p21.3 | 7936 |
| 201976_s_at | 0.00944 | 1.10 | myosin X | MYO10 | 5p15.1-p14.3 | 4651 |
| 203931_s_at | 0.00653 | 1.10 | mitochondrial ribosomal protein L12 | MRPL12 | 17q25 | 6182 |
| 228142_at | 0.00672 | 1.10 | ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit X | UQCRI0 | 22cen-q12.3 | 29796 |
| 233168_s_at | 0.00719 | 1.10 | selenoprotein O | SELO | 22q13.33 | 83642 |
| 213061_s_at | 0.00992 | 1.10 | N-terminal asparagine amidase | NTAN1 | 16p13.11 | 123803 |
| 226845_s_at | 0.00528 | 1.10 | myeloma overexpressed 2 | MYEOV2 | 2q37.3 | 150678 |
| 217962_at | 0.00583 | 1.10 | NOP10 ribonucleoprotein homolog (yeast) | NOP10 | 15q14-q15 | 55505 |
| 213215_at | 0.00867 | 1.10 | adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit | AP3S2 | 15q26.1 | 10239 |
| 203366_at | 0.00225 | 1.10 | polymerase (DNA directed), gamma | POLG | 15q25 | 5428 |
| 202040_s_at | 0.00343 | 1.10 | lysine (K)-specific demethylase 5A | KDMA5A | 12p11 | 5927 |
| 242750_at | 0.00367 | 1.10 | methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblA type | MMMAA | 4q31.21 | 166785 |
| 243130_at | 0.00831 | 1.10 | clone IMAGE:926099 | | | |
| 225533_at | 0.00249 | 1.10 | PHD finger protein 19 | PHF19 | 9q33.2 | 26147 |
| 202447_at | 0.00804 | 1.10 | 2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial | DECRI1 | 8q21.3 | 1666 |
| 223978_s_at | 0.00809 | 1.10 | cardiolipin synthase 1 | CRLS1 | 20p13-p12.3 | 54675 |

| | | | | | | | |
|--------------|---------|------|--|--------------|-----------|-----------|---|
| 235870_at | 0.00981 | 1.10 | hypothetical LOC339524 | LOC339524 | 1p22.3 | 339524 | 8 |
| 1556675_s_at | 0.00295 | 1.09 | uncharacterized LOC100507584 | LOC100507584 | | 100507584 | |
| 244052_at | 0.00396 | 1.09 | carbonyl reductase 4 | CBR4 | 4q32.3 | 84869 | |
| 226024_at | 0.00470 | 1.09 | copper metabolism (Murr1) domain containing 1 | COMMD1 | 2p15 | 150684 | |
| 229867_at | 0.00684 | 1.09 | BTB (POZ) domain containing 9 | BTBD9 | 6p21 | 114781 | |
| 218301_at | 0.00771 | 1.09 | arginyl aminopeptidase (aminopeptidase B)-like 1 | RNPEPL1 | 2q37.3 | 57140 | |
| 226915_s_at | 0.00453 | 1.09 | actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like | ARPC5L | 9q33.3 | 81873 | |
| 34868_at | 0.00658 | 1.09 | smg-5 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans) | SMG5 | 1q21.2 | 23381 | |
| 204808_s_at | 0.00705 | 1.09 | transmembrane protein 5 | TMEM5 | 12q14.2 | 10329 | |
| 213567_at | 0.00913 | 1.09 | karyopherin alpha 4 (importin alpha 3) | KPNA4 | 3q25.33 | 3840 | |
| 218450_at | 0.00587 | 1.09 | heme binding protein 1 | HEBP1 | 12p13.1 | 50865 | |
| 217621_at | 0.00622 | 1.09 | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 2 | SLC6A2 | 16q12.2 | 6530 | |
| 244689_at | 0.00771 | 1.09 | peroxisome proliferator-activated receptor alpha | PPARA | | 5465 | |
| 203617_x_at | 0.00838 | 1.09 | ELK1, member of ETS oncogene family | ELK1 | Xp11.2 | 2002 | |
| 205963_s_at | 0.00958 | 1.09 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3 | DNAAJ3 | 16p13.3 | 9093 | |
| 217896_s_at | 0.00655 | 1.09 | family with sequence similarity 192, member A | FAM192A | 16q13 | 80011 | |
| 234312_s_at | 0.00666 | 1.09 | acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 | ACSS2 | 20q11.22 | 55902 | |
| 227869_at | 0.00678 | 1.09 | family with sequence similarity 104, member B | FAM104B | Xp11.21 | 90736 | |
| 217772_s_at | 0.00716 | 1.09 | mitochondrial carrier 2 | MTCH2 | 11p11.2 | 23788 | |
| 201986_at | 0.00770 | 1.09 | mediator complex subunit 13 | MED13 | 17q22-q23 | 9969 | |
| 237831_x_at | 0.00866 | 1.09 | methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblA type | MMMAA | 4q31.21 | 166785 | |
| 228811_at | 0.00539 | 1.09 | clone IMAGE:2132032 | | | | |
| 219220_x_at | 0.00563 | 1.09 | mitochondrial ribosomal protein S22 | MRP22 | 3q23 | 56945 | |
| 203594_at | 0.00635 | 1.09 | RNA 3'-terminal phosphate cyclase | RTCA | 1p21.2 | 8634 | |
| 201536_at | 0.00650 | 1.09 | dual specificity phosphatase 3 | DUSP3 | 17q21 | 1845 | |
| 242214_at | 0.00702 | 1.09 | ribosomal protein S27a | RPS27A | | 6233 | |
| 226692_at | 0.00856 | 1.09 | chromosome 15 open reading frame 63; small EDRK-rich factor 2 | SERF2 | 15q15.3 | 10169 | |
| 202288_at | 0.00494 | 1.09 | mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase) | MTOR | 1p36.2 | 2475 | |
| 209531_at | 0.00611 | 1.09 | glutathione transferase zeta 1 | GSTZ1 | 14q24.3 | 2954 | |
| 220946_s_at | 0.00986 | 1.09 | SET domain containing 2 | SETD2 | 3p21.31 | 29072 | |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|-----------------|----------------|--------|
| 238702_at | 0.00990 | 1.09 | serine palmitoyltransferase, small subunit B | SPTSSB | 3q26.1 | 165679 |
| 204703_at | 0.00749 | 1.09 | intraflagellar transport 88 homolog (Chlamydomonas) | IFT88 | 13q12.1 | 8100 |
| 202844_s_at | 0.00811 | 1.09 | ralA binding protein 1 | RALBP1 | 18p11.3 | 10928 |
| 226157_at | 0.00690 | 1.09 | transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2) | TFDP2 | 3q23 | 7029 |
| 205501_at | 0.00988 | 1.09 | phosphodiesterase 10A | PDE10A | 6q26 | 10846 |
| 205315_s_at | 0.00966 | 1.09 | syntrophin, beta 2 (dystrophin-associated protein A1) | SNTB2 | 16q22.1 | 6645 |
| 208847_s_at | 0.00586 | 1.08 | alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide | ADH5 | 4q23 | 128 |
| 218059_at | 0.00964 | 1.08 | zinc finger protein 706 | ZNF706 | 8q22.3 | 51123 |
| 37966_at | 0.00743 | 1.08 | parvin, beta | PARVB | 22q13.2-q13.33 | 29780 |
| 213628_at | 0.00865 | 1.08 | chloride channel CLIC-like 1 | CLCC1 | 1p13.3 | 23155 |
| 209077_at | 0.00460 | 1.08 | thioredoxin 2 | TXN2 | 22q13.1 | 25828 |
| 201182_s_at | 0.00954 | 1.08 | chromodomain helicase DNA binding protein 4 | CHD4 | 12p13 | 1108 |
| 1556413_a_at | 0.00691 | 1.08 | ADAM1 metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9 | ADAMTS9 | 3p14.1 | 56999 |
| 214959_s_at | 0.00949 | 1.08 | API5-like 1; apoptosis inhibitor 5 | API5 | 11p11.2 | 8539 |
| 224729_s_at | 0.00842 | 1.08 | ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1 | ATPAF1 | 1p33-p32.3 | 64756 |
| 212656_at | 0.00904 | 1.08 | Ts translation elongation factor, mitochondrial | TSFM | 12q14.1 | 10102 |
| 228611_s_at | 0.00730 | 1.08 | chromosome 3 open reading frame 17 | c3orf17 | 3q13.2 | 25871 |
| 1558831_x_at | 0.00756 | 0.93 | cDNA FLJ34403 fis | | | |
| 205988_at | 0.00880 | 0.93 | CD84 molecule | CD84 | 1q24 | 8832 |
| 203044_at | 0.00731 | 0.92 | chondroitin sulfate synthase 1 | CHSY1 | 15q26.3 | 22856 |
| 204342_at | 0.00776 | 0.92 | solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier) | SLC25A24 | 1p13.3 | 29957 |
| 232911_at | 0.00530 | 0.92 | zinc finger protein 14 homolog (mouse) | ZFP14 | 19q13.12 | 57677 |
| 220775_s_at | 0.00710 | 0.92 | UEV and lactate/malate dehydrogenase domains | UEVLD | 11p15.1 | 55293 |
| 239266_at | 0.00837 | 0.92 | clone IMAGE:307130 | | | |
| 213113_s_at | 0.00847 | 0.92 | solute carrier family 43, member 3 | SLC43A3 | 11q11 | 29015 |
| 222663_at | 0.00657 | 0.92 | RIO kinase 2 (yeast) | RIOK2 | 5q15 | 55781 |
| 224973_at | 0.00358 | 0.92 | family with sequence similarity 46, member A | FAM46A | 6q14 | 55603 |
| 1562546_at | 0.00581 | 0.92 | cDNA FLJ37229 fis | | | |
| 224237_at | 0.00372 | 0.91 | PRO2372 mRNA | | | |
| 233753_at | 0.00465 | 0.91 | SR-related CTD-associated factor 4 | SCAF4 | 21q22.1 | 57466 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|-----------------|------------------|--------|
| 209411_s_at | 0.00505 | 0.91 | golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein | GGA3 | 17q25.1 | 23163 |
| 206524_at | 0.00547 | 0.91 | T, brachyury homolog (mouse) | T | 6q27 | 6862 |
| 217866_at | 0.00640 | 0.91 | cleavage and polyadenylation specific factor 7, 59kDa | CPSF7 | 11q12.2 | 79869 |
| 203482_at | 0.00532 | 0.91 | family with sequence similarity 178, member A | FAM178A | 10q24.31 | 55719 |
| 227250_at | 0.00628 | 0.91 | kringle containing transmembrane protein 1 | KREMEN1 | 22q12.1 | 83999 |
| 231989_s_at | 0.00682 | 0.91 | SMG1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase | SMG1P1 | 16p12.2 | 641298 |
| 231177_at | 0.00883 | 0.91 | host cell factor C1 (VP16-accessory protein) | HCFC1 | Xq28 | 3054 |
| 244259_s_at | 0.00928 | 0.91 | clone IMAGE:1751496 | | | |
| 223638_at | 0.00666 | 0.91 | neuroblastoma breakpoint family, member 3 | NBPF3 | 1p36.12 | 84224 |
| 240941_at | 0.00989 | 0.91 | intersectin 2 | ITSN2 | 2pter-p25.1 | 50618 |
| 242608_x_at | 0.00436 | 0.91 | family with sequence similarity 161, member B | FAM161B | 14q24.3 | 145483 |
| 213584_s_at | 0.00784 | 0.91 | CREB/ATF bZIP transcription factor | CREBZF | 11q14 | 58487 |
| 1553678_a_at | 0.00796 | 0.91 | integrin, beta 1 (fibronectin receptor, includes MDF2, MSK12) | ITGB1 | 10p11.2 | 3688 |
| 236065_at | 0.00392 | 0.91 | clone IMAGE:3573566 | | | |
| 240665_at | 0.00548 | 0.91 | CUG triplet repeat, RNA binding protein 2 | CELF2 | 10p13 | 10659 |
| 232644_x_at | 0.00624 | 0.91 | OCLA domain containing 1 | OCLA1 | 4p11 | 54940 |
| 1553533_at | 0.00685 | 0.91 | junctophilin 1 | JPH1 | 8q21 | 56704 |
| 201504_s_at | 0.00487 | 0.91 | translin | TSN | 2q21.1 | 7247 |
| 212964_at | 0.00767 | 0.91 | hypermethylated in cancer 2 | HIC2 | 22q11.21 | 23119 |
| 1566029_at | 0.00223 | 0.91 | phosphatase and actin regulator 3 | Phactr3 | 20q13.32-q13.33 | 116154 |
| 1554310_a_at | 0.00375 | 0.91 | eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3 | EIF4G3 | 1p36.12 | 8672 |
| 239104_at | 0.00404 | 0.91 | uncharacterized locus MGC42157 | MGC42157 | 4p14 | 439933 |
| 239757_at | 0.00549 | 0.91 | zinc finger, AN1-type domain 6 | ZFAND6 | 15q25.1 | 54469 |
| 236409_at | 0.00323 | 0.90 | lysophospholipase-like 1 | LYPLAL1 | 1q41 | 127018 |
| 232614_at | 0.00397 | 0.90 | B-cell CLL/lymphoma 2 | BCL2 | 18q21.33 18q21.3 | 596 |
| 223949_at | 0.00510 | 0.90 | transmembrane protease, serine 3 | TMPPRSS3 | 21q22.3 | 64699 |
| 217070_at | 0.00544 | 0.90 | methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H) | MTHFR | 1p36.3 | 4524 |
| 212515_s_at | 0.00367 | 0.90 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked | DDX3X | Xp11.3-p11.23 | 1654 |
| 201210_at | 0.00371 | 0.90 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked | DDX3X | Xp11.3-p11.23 | 1654 |
| 222074_at | 0.00410 | 0.90 | uroporphyrinogen decarboxylase | UROD | 1p34 | 7389 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|-----------------|---------------|--------|
| 213650_at | 0.00528 | 0.90 | golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8B | GOLGA8B | 15q14 | 440270 |
| 219093_at | 0.00636 | 0.90 | phosphotyrosine interaction domain containing 1 | PID1 | 2q36.3 | 55022 |
| 207820_at | 0.00653 | 0.90 | alcohol dehydrogenase 1A (class I), alpha polypeptide | ADH1A | 4q23 | 124 |
| 1561545_at | 0.00778 | 0.90 | epsin 2 | EPN2 | 17p11.2 | 22905 |
| 217211_at | 0.00854 | 0.90 | actin, beta pseudogene 9 | ACTBP9 | 18q21.33 | 69 |
| 238441_at | 0.00955 | 0.90 | protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit | PRKAA2 | 1p31 | 5563 |
| 242029_at | 0.00246 | 0.90 | fibronectin type III domain containing 3B | FNDG3B | 3q26.31 | 64778 |
| 222918_at | 0.00792 | 0.90 | RAB9B, member RAS oncogene family | RAB9B | Xq22.1-q22.3 | 51209 |
| 237189_at | 0.00342 | 0.90 | homeobox B2 | HOXB2 | 17q21.32 | 3212 |
| 213137_s_at | 0.00508 | 0.90 | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2 | PTPN2 | 18p11.3-p11.2 | 5771 |
| 204457_s_at | 0.00515 | 0.90 | growth arrest-specific 1 | GAS1 | 9q21.3-q22 | 2619 |
| 204995_at | 0.00621 | 0.90 | cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35) | CDK5R1 | 17q11.2 | 8851 |
| 213469_at | 0.00627 | 0.90 | post-GPI attachment to proteins 1 | PGAP1 | 2q33.1 | 80055 |
| 216756_at | 0.00913 | 0.90 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine 7 | Galnt7 | 4q31.1 | 51809 |
| 205247_at | 0.00541 | 0.90 | notch 4 | NOTCH4 | 6p21.3 | 4855 |
| 204044_at | 0.00312 | 0.90 | quinolinate phosphoribosyltransferase | QPRT | 16p11.2 | 23475 |
| 224830_at | 0.00323 | 0.90 | nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21 | NUDT21 | 16q12.2 | 11051 |
| 239854_at | 0.00571 | 0.90 | synaptonemal complex central element protein 3 | SYCE3 | 22q13.33 | 644186 |
| 221961_at | 0.00737 | 0.90 | chloride channel 7 | CLCN7 | 16p13 | 1186 |
| 243707_at | 0.00748 | 0.90 | linc-TLL7-2 | | | |
| 203568_s_at | 0.00767 | 0.90 | tripartite motif containing 38 | TRIM38 | 6p21.3 | 10475 |
| 231109_at | 0.00866 | 0.90 | CUG triplet repeat, RNA binding protein 2 | CELF2 | 10p13 | 10659 |
| 214533_at | 0.00866 | 0.90 | chymase 1, mast cell | CMA1 | 14q11.2 | 1215 |
| 1570552_at | 0.00169 | 0.90 | tetratricopeptide repeat domain 39C | TTC39C | 18q11.2 | 125488 |
| 210272_at | 0.00426 | 0.90 | cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 7 pseudogene 1 | CYP2B7P1 | 19q13.2 | 1556 |
| 1555594_a_at | 0.00635 | 0.90 | muscleblind-like splicing regulator 1 | MBNL1 | 3q25 | 4154 |
| 232068_s_at | 0.00750 | 0.90 | toll-like receptor 4 | TLR4 | 9q33.1 | 7099 |
| 1556035_s_at | 0.00897 | 0.90 | zinc finger protein 207 | ZNF207 | 17q11.2 | 7756 |
| 224699_s_at | 0.00939 | 0.90 | family with sequence similarity 62 (C2 domain containing), member B | ESYT2 | 7q36.3 | 57488 |
| 1566924_at | 0.00324 | 0.90 | cDNA: FLJ20971 fi | | | |

| | | | | | | |
|-------------|---------|------|---|----------|-----------------|--------|
| 205257_s_at | 0.00343 | 0.90 | amphiphysin | AMPH | 7p14-p13 | 273 |
| 1557081_at | 0.00570 | 0.90 | RNA binding motif protein 25 | RBM25 | 14q24.3 | 58517 |
| 238489_at | 0.00588 | 0.90 | protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit | PRKAA2 | 1p31 | 5563 |
| 212460_at | 0.00798 | 0.90 | serine palmitoyltransferase, small subunit A | SPTSSA | 14q13.1 | 171546 |
| 1570126_at | 0.00279 | 0.90 | clone IMAGE:5015646 | | | |
| 203506_s_at | 0.00444 | 0.90 | mediator complex subunit 12 | MED12 | Xq13 | 9968 |
| 233595_at | 0.00722 | 0.90 | ubiquitin specific peptidase 34 | USP34 | 2p15 | 9736 |
| 42361_g_at | 0.00144 | 0.89 | coiled-coil alpha-helical rod protein 1 | CCHCR1 | 6p21.3 | 54535 |
| 232124_at | 0.00196 | 0.89 | family with sequence similarity 198, member A | FAM198A | 3p22.1 | 26172 |
| 241245_at | 0.00291 | 0.89 | splicing factor, arginine/serine-rich 4 | SFRS4 | | 6429 |
| 232363_at | 0.00418 | 0.89 | PC4 and SFRS1 interacting protein 1 | PSIP1 | 9p22.3 | 11168 |
| 213517_at | 0.00434 | 0.89 | poly(rC) binding protein 2 | PCBP2 | 12q13.12-q13.13 | 5094 |
| 235927_at | 0.00610 | 0.89 | exportin 1 (CRM1 homolog, yeast) | XPO1 | 2p16 | 7514 |
| 232846_s_at | 0.00974 | 0.89 | cadherin-related 23 | CDH23 | 10q22.1 | 64072 |
| 230441_at | 0.00142 | 0.89 | pleckstrin homology domain containing, family G member 4B | PLEKHG4B | 5p15.33 | 153478 |
| 226939_at | 0.00253 | 0.89 | cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 | CPEB2 | 4p15.33 | 132864 |
| 237333_at | 0.00456 | 0.89 | retinoblastoma binding protein 4 | RBBP4 | 1p35.1 | 5928 |
| 209822_s_at | 0.00465 | 0.89 | very low density lipoprotein receptor | VLDLR | 9p24 | 7436 |
| 242725_at | 0.00467 | 0.89 | KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 2 | KDELR2 | 7p22.1 | 11014 |
| 226730_s_at | 0.00868 | 0.89 | ubiquitin specific peptidase 37 | USP37 | 2q35 | 57695 |
| 211537_x_at | 0.00336 | 0.89 | mitogen-activated protein kinase kinase 7 | MAP3K7 | 6q15 | 6885 |
| 215032_at | 0.00603 | 0.89 | ras responsive element binding protein 1 | RREB1 | 6p25 | 6239 |
| 233898_s_at | 0.00265 | 0.89 | FGFR1 oncogene partner 2 | FGFR1OP2 | 12p11.23 | 26127 |
| 239848_at | 0.00421 | 0.89 | eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M | EIF3M | 11p13 | 10480 |
| 235305_s_at | 0.00442 | 0.89 | enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 2 | ECHDC2 | 1p32.3 | 55268 |
| 211998_at | 0.00570 | 0.89 | H3 histone, family 3B (H3.3B) | H3F3B | 1q42.12 | 3020 |
| 231815_at | 0.00649 | 0.89 | PHD finger protein 12 | PHF12 | 17q11.2 | 57649 |
| 222827_s_at | 0.00290 | 0.89 | kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10 | KBTBD10 | 2q31.1 | 10324 |
| 239528_at | 0.00323 | 0.89 | prominin 2 | PROM2 | 2q11.1 | 150696 |
| 224959_at | 0.00111 | 0.89 | solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2 | SLC26A2 | 5q31-q34 | 1836 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|---------------------|----------|-----------|
| 220984_s_at | 0.00240 | 0.89 | solute carrier organic anion transporter family, member 5A1 | SLCO5A1 | 8q13.3 | 81796 |
| 243292_at | 0.00450 | 0.89 | family with sequence similarity 132, member A | FAM132A | 1p36.33 | 388581 |
| 219972_s_at | 0.00797 | 0.89 | chromosome 14 open reading frame 135 | C14orf135 | 14q23.1 | 64430 |
| 212881_at | 0.00072 | 0.89 | protein inhibitor of activated STAT, 4 | PIAS4 | 19p13.3 | 51588 |
| 200751_s_at | 0.00346 | 0.89 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2) | HNRNPC | 14q11.2 | 3183 |
| 210971_s_at | 0.00919 | 0.89 | aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like | ARNTL | 11p15 | 406 |
| 215242_at | 0.00963 | 0.89 | phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class C | PIGC | 1q23-q25 | 5279 |
| 228857_at | 0.00166 | 0.89 | guanine nucleotide binding protein-like 1 | GNL1 | 6p21.3 | 2794 |
| 1560089_at | 0.00210 | 0.89 | uncharacterized LOC100289019 | LOC100289019 | | 100289019 |
| 1558758_s_at | 0.00421 | 0.89 | chromosome 12 open reading frame 49 | c12orf49 | 12q24.22 | 79794 |
| 239146_at | 0.00428 | 0.89 | claudin domain containing 1 | CLDND1 | 3q12.1 | 56650 |
| 217851_s_at | 0.00482 | 0.89 | slowmo homolog 2 (Drosophila) | SLMO2 | 20q13.32 | 51012 |
| 1569652_at | 0.00101 | 0.89 | myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia | MILLT3 | 9p22 | 4300 |
| 226984_at | 0.00140 | 0.89 | FYVE, RhoGEF and PH domain containing 5 | FGD5 | 3p25.1 | 152273 |
| 204719_at | 0.00406 | 0.89 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8 | ABCA8 | 17q24 | 10351 |
| 219734_at | 0.00445 | 0.89 | SID1 transmembrane family, member 1 | SIDT1 | 3q13.2 | 54847 |
| 215465_at | 0.00910 | 0.89 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12 | ABCA12 | 2q34 | 26154 |
| 1560199_x_at | 0.00175 | 0.89 | FAM133B pseudogene | LOC728153 | 5q12.1 | 728153 |
| 228466_at | 0.00790 | 0.89 | GA binding protein transcription factor, beta subunit 2 | GABPB2 | 1q21.3 | 126626 |
| 228334_x_at | 0.00224 | 0.88 | centrosomal protein 44kDa | CEP44 | 4q34 | 80817 |
| 228338_at | 0.00284 | 0.88 | chromosome 11 open reading frame 93 | C11orf93 | 11q23.1 | 120376 |
| 231001_at | 0.00580 | 0.88 | fin bud initiation factor homolog (zebrafish) | FIBIN | 11p14.2 | 387758 |
| 1554679_a_at | 0.00705 | 0.88 | lysosomal protein transmembrane 4 beta | LAPTM4B | 8q22.1 | 55353 |
| 227199_at | 0.00469 | 0.88 | DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (Drosophila) | DIP2A | 21q22.3 | 23181 |
| 212176_at | 0.00101 | 0.88 | PNN-interacting serine/arginine-rich protein | PNISR | 6q16.3 | 25957 |
| 225421_at | 0.00150 | 0.88 | peptidase M20 domain containing 2 | PM20D2 | 6q15 | 135293 |
| 238461_at | 0.00457 | 0.88 | eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3 | EIF4E3 | 3p14 | 317649 |
| 224567_x_at | 0.00899 | 0.88 | metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 | MALAT1 | 11q13.1 | 378938 |
| 1553684_at | 0.00965 | 0.88 | peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 6 | PP1L6 | 6q21 | 285755 |
| 229409_s_at | 0.00977 | 0.88 | 2-aminoethanethiol (cysteamine) dioxygenase | ADO | 10q21.3 | 84890 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|----------|-----------|--------|
| 233185_at | 0.00170 | 0.88 | integrin, beta-like 1 (with EGF-like repeat domains) | ITGBL1 | 13q33 | 9358 |
| 229111_at | 0.00176 | 0.88 | clone IMAGE:375670 | | | |
| 242787_at | 0.00118 | 0.88 | inner centromere protein antigens 135/155kDa | INCENP | 11q12.3 | 3619 |
| 1553530_a_at | 0.00221 | 0.88 | integrin, beta 1 (fibronectin receptor, includes MDF2, MSK12) | ITGB1 | 10p11.2 | 3688 |
| 229966_at | 0.00849 | 0.88 | Ewing sarcoma breakpoint region 1 | EWSR1 | 22q12.2 | 2130 |
| 214293_at | 0.00091 | 0.88 | septin 11 | sept-11 | 4q21.1 | 55752 |
| 211905_s_at | 0.00418 | 0.88 | integrin, beta 4 | ITGB4 | 17q25 | 3691 |
| 212747_at | 0.00738 | 0.88 | ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 1A | ANKS1A | 6p21.31 | 23294 |
| 210912_x_at | 0.00084 | 0.88 | glutathione S-transferase mu 4 | GSTM4 | 1p13.3 | 2948 |
| 225839_at | 0.00087 | 0.88 | RNA binding motif protein 33 | RBM33 | 7q36.3 | 155435 |
| 236291_at | 0.00109 | 0.88 | retinol dehydrogenase 5 (11-cis/9-cis) | RDH5 | 12q13-q14 | 5959 |
| 205002_at | 0.00118 | 0.88 | AT hook, DNA binding motif, containing 1 | AHDC1 | 1p36.13 | 27245 |
| 208056_s_at | 0.00901 | 0.88 | core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 3 | CBFA2T3 | 16q24 | 863 |
| 207089_at | 0.00940 | 0.88 | nebulin-related anchoring protein | NRAP | 10q24-q26 | 4892 |
| 1557521_a_at | 0.00134 | 0.88 | bladder cancer associated protein | BLCAP | 20q11.23 | 10904 |
| 232216_at | 0.00327 | 0.88 | YME1-like 1 (S. cerevisiae) | YME1L1 | 10p14 | 10730 |
| 214323_s_at | 0.00410 | 0.88 | UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast) | UPF3A | 13q34 | 65110 |
| 243958_at | 0.00528 | 0.88 | mannosyl-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, A | MGAT4A | 2q12 | 11320 |
| 212755_at | 0.00061 | 0.88 | MON2 homolog (S. cerevisiae) | MON2 | 12q14.1 | 23041 |
| 227038_at | 0.00169 | 0.88 | sphingomyelin synthase 2 | SGMS2 | 4q25 | 166929 |
| 228030_at | 0.00467 | 0.88 | RNA binding motif protein 6 | RBM6 | 3p21.3 | 10180 |
| 221919_at | 0.00969 | 0.88 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 | HNRNPA1 | 12q13.1 | 3178 |
| 232762_at | 0.00022 | 0.87 | KIAA1217 | KIAA1217 | 10p12.31 | 56243 |
| 225711_at | 0.00035 | 0.87 | ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 6 | ARL6IP6 | 2q23.3 | 151188 |
| 222735_at | 0.00066 | 0.87 | transmembrane protein 38B | TMEM38B | 9q31.2 | 55151 |
| 201663_s_at | 0.00019 | 0.87 | structural maintenance of chromosomes 4 | SMC4 | 3q26.1 | 10051 |
| 228606_at | 0.00249 | 0.87 | Tctex1 domain containing 2 | TCTEX1D2 | 3q29 | 116211 |
| 238744_at | 0.00323 | 0.87 | clone IMAGE:2107523 | | | |
| 214370_at | 0.00976 | 0.87 | S100 calcium binding protein A8 | S100A8 | 1q21 | 6279 |
| 226816_s_at | 0.00034 | 0.87 | KIAA1143 | KIAA1143 | 3p21.31 | 57456 |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|--------------|-----------------|-----------|
| 208703_s_at | 0.00348 | 0.87 | amyloid beta (A4) precursor-like protein 2 | APLP2 | 11q23-q25 11q24 | 334 |
| 227321_at | 0.00408 | 0.87 | GATS, stromal antigen 3 opposite strand | GATS | 7q22.1 | 352954 |
| 225188_at | 0.00467 | 0.87 | Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1 | RAPH1 | 2q33 | 65059 |
| 225820_at | 0.00826 | 0.87 | PHD finger protein 17 | PHF17 | 4q26-q27 | 79960 |
| 224909_s_at | 0.00206 | 0.87 | phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac | PREX1 | 20q13.13 | 57580 |
| 211547_s_at | 0.00229 | 0.87 | platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1 | PAFAH1B1 | 17p13.3 | 5048 |
| 235944_at | 0.00812 | 0.87 | hemocentin 1 | HMCN1 | 1q25.3-q31.1 | 83872 |
| 224227_s_at | 0.00094 | 0.87 | B double prime 1, subunit of RNA polymerase III | BDP1 | 5q13 | 55814 |
| 240908_at | 0.00268 | 0.87 | uncharacterized LOC100507153 | LOC100507153 | | 100507153 |
| 1565867_a_at | 0.00531 | 0.87 | zinc finger CCCH-type containing 11A | ZC3H11A | 1q32.1 | 9877 |
| 219773_at | 0.01410 | 0.87 | NADPH oxidase 4 | NOX4 | 11q14.2-q21 | 50507 |
| 209094_at | 0.00007 | 0.87 | dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 | DDAH1 | 1p22 | 23576 |
| 218772_x_at | 0.00311 | 0.87 | transmembrane protein 38B | TMEM38B | 9q31.2 | 55151 |
| 240383_at | 0.00314 | 0.87 | ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 | UBE2D3 | 4q24 | 100037280 |
| 207797_s_at | 0.00623 | 0.87 | LRP2 binding protein | LRP2BP | 4q35.1 | 55805 |
| 202150_s_at | 0.00868 | 0.87 | neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 | NEDD9 | 6p25-p24 | 4739 |
| 238763_at | 0.00879 | 0.87 | RNA binding motif protein 20 | RBM20 | 10q25.2 | 282996 |
| 1557522_x_at | 0.00124 | 0.87 | bladder cancer associated protein | BLCAP | 20q11.23 | 10904 |
| 210017_at | 0.00131 | 0.87 | mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1 | MALT1 | 18q21 | 10892 |
| 203766_s_at | 0.00370 | 0.87 | leiomodlin 1 (smooth muscle) | LMOD1 | 1q32 | 25802 |
| 224549_x_at | 0.00063 | 0.87 | staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1 | SND1 | 7q31.3 | 27044 |
| 221646_s_at | 0.00113 | 0.87 | zinc finger, DHHC-type containing 11 | ZDHHC11 | 5p15.33 | 79844 |
| 241443_at | 0.00487 | 0.87 | acireductone dioxygenase 1 | AD11 | 2p25.3 | 55256 |
| 207738_s_at | 0.00521 | 0.87 | NCK-associated protein 1 | NCKAP1 | 2q32 | 10787 |
| 223474_at | 0.00263 | 0.86 | interferon regulatory factor 2 binding protein-like | IRF2BPL | 14q24.3 | 64207 |
| 232002_at | 0.00944 | 0.86 | glucose phosphate isomerase | GPI | 19q13.1 | 2821 |
| 221840_at | 0.00584 | 0.86 | protein tyrosine phosphatase, receptor type, E | PTPRE | 10q26 | 5791 |
| 209288_s_at | 0.00637 | 0.86 | CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3 | CDC42EP3 | 2p21 | 10602 |
| 225107_at | 0.00699 | 0.86 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 | HNRNPA2B1 | 7p15 | 3181 |
| 202193_at | 0.00047 | 0.86 | LIM domain kinase 2 | LIMK2 | 22q12.2 | 3985 |

| | | | | | | | |
|-------------|---------|------|--|--------------|---------------|-----------|----|
| 39966_at | 0.00125 | 0.86 | chondroitin sulfate proteoglycan 5 (neuroglycan C) | CSPG5 | 3p21.3 | 10675 | 21 |
| 1557852_at | 0.00556 | 0.86 | polyhomeotic homolog 2 (Drosophila) | PHC2 | 1p34.3 | 1912 | |
| 211302_s_at | 0.00023 | 0.86 | phosphodiesterase 4B, cAMP-specific | PDE4B | 1p31 | 5142 | |
| 230198_at | 0.00015 | 0.86 | hypothetical LOC100130837 | LOC100130837 | 10p15.3 | 100130837 | |
| 204748_at | 0.00024 | 0.86 | prostaglandin-endoperoxide synthase 2 | PTGS2 | 1q25.2-q25.3 | 5743 | |
| 213653_at | 0.00057 | 0.86 | methyltransferase like 3 | METT13 | 14q11.1 | 56339 | |
| 206958_s_at | 0.00081 | 0.86 | UPF3 regulator of nonsense transcripts homolog A (yeast) | UPF3A | 13q34 | 65110 | |
| 216737_at | 0.00110 | 0.86 | cDNA: FLJ20872 fis | | | | |
| 210425_x_at | 0.00105 | 0.86 | golgin A8 family, member B | GOLGA8B | 15q14 | 440270 | |
| 228758_at | 0.00161 | 0.86 | B-cell CLL/lymphoma 6 | BCL6 | 3q27 | 604 | |
| 223940_x_at | 0.00197 | 0.86 | metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 | MALAT1 | 11q13.1 | 378938 | |
| 202431_s_at | 0.00309 | 0.86 | v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) | MYC | 8q24.21 | 4609 | |
| 213906_at | 0.00401 | 0.86 | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 1 | MYBL1 | 8q22 | 4603 | |
| 240654_at | 0.00066 | 0.86 | cadherin 4, type 1, R-cadherin (retinal) | CDH4 | 20q13.3 | 1002 | |
| 212966_at | 0.00148 | 0.86 | hypermethylated in cancer 2 | HIC2 | 22q11.21 | 23119 | |
| 220016_at | 0.00666 | 0.86 | AHNAK nucleoprotein | AHNAK | 11q12.2 | 79026 | |
| 227133_at | 0.00083 | 0.86 | family with sequence similarity 199, X-linked | FAM199X | Xq22.2 | 139231 | |
| 220244_at | 0.00227 | 0.86 | long intergenic non-protein coding RNA 312 | LINC00312 | 3p25.3 | 29931 | |
| 240307_at | 0.00012 | 0.85 | clone IMAGE-2420466 | | | | |
| 1556332_at | 0.00154 | 0.85 | cDNA FLJ38412 fis | | | | |
| 226665_at | 0.00697 | 0.85 | AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 2 | AHAS2 | 2p15 | 130872 | |
| 220574_at | 0.00775 | 0.85 | sema domain, transmembrane and cytoplasmic domain | SEMA6D | 15q21.1 | 80031 | |
| 1557388_at | 0.00032 | 0.85 | rotatin | RTTN | 18q22.2 | 25914 | |
| 202887_s_at | 0.00085 | 0.85 | DNA-damage-inducible transcript 4 | DDIT4 | 10pter-q26.12 | 54541 | |
| 209286_at | 0.00325 | 0.85 | CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3 | CDC42EP3 | 2p21 | 10602 | |
| 226591_at | 0.00201 | 0.85 | small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N | SNRPN | 15q11.2 | 6638 | |
| 214805_at | 0.00342 | 0.85 | eukaryotic translation initiation factor 4A1 | EIF4A1 | 17p13 | 1973 | |
| 224568_x_at | 0.00088 | 0.85 | metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 | MALAT1 | 11q13.1 | 378938 | |
| 209234_at | 0.00384 | 0.85 | kinesin family member 1B | KIF1B | 1p36.2 | 23095 | |
| 223494_at | 0.00330 | 0.85 | meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase) | MGEA5 | 10q24.1-q24.3 | 10724 | |

| | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|-----------|----------------|--------|
| 204567_s_at | 0.00910 | 0.85 | ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1 | ABCG1 | 21q22.3 | 9619 |
| 228885_at | 0.00275 | 0.85 | MAM domain containing 2 | MAMDC2 | 9q21.12 | 256691 |
| 214093_s_at | 0.00562 | 0.85 | far upstream element (FUSE) binding protein 1 | FUBP1 | 1p31.1 | 8880 |
| 217936_at | 0.00070 | 0.85 | Rho GTPase activating protein 5 | ARRGAP5 | 14q12 | 394 |
| 201761_at | 0.00128 | 0.85 | methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2 | MTHFD2 | 2p13.1 | 10797 |
| 213268_at | 0.00431 | 0.85 | calmodulin binding transcription activator 1 | CAMTA1 | 1p36.31-p36.23 | 23261 |
| 206163_at | 0.00028 | 0.84 | mab-21-like 1 (C. elegans) | MAB21L1 | 13q13 | 4081 |
| 1558512_at | 0.00007 | 0.84 | clone IMAGE:5607466 | | | |
| 226769_at | 0.00578 | 0.84 | fin bud initiation factor homolog (zebrafish) | FIBIN | 11p14.2 | 387758 |
| 1557293_at | 0.00486 | 0.84 | uncharacterized LOC440993 | LOC440993 | 3q29 | 440993 |
| 232436_at | 0.00062 | 0.84 | zinc finger protein 274 | ZNF274 | 19qter | 10782 |
| 227702_at | 0.00182 | 0.84 | cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1 | CYP4X1 | 1p33 | 260293 |
| 244327_at | 0.00164 | 0.84 | phosphorylase kinase, alpha 1 pseudogene 1 | PHKA1 | Xq12-q13 | 5255 |
| 1555370_a_at | 0.00512 | 0.84 | calmodulin binding transcription activator 1 | CAMTA1 | 1p36.31-p36.23 | 23261 |
| 236019_at | 0.00009 | 0.84 | RAB12, member RAS oncogene family | RAB12 | 18p11.22 | 201475 |
| 235904_at | 0.00280 | 0.84 | UDP glycosyltransferase 3 family, polypeptide A1 | UGT3A1 | 5p13.2 | 133688 |
| 225685_at | 0.00077 | 0.83 | CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3 | CDC42EP3 | 2p21 | 10602 |
| 223322_at | 0.00123 | 0.83 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 5 | RASSF5 | 1q32.1 | 83593 |
| 226272_at | 0.00150 | 0.83 | RCAN family member 3 | RCAN3 | 1p35.3-p33 | 11123 |
| 210461_s_at | 0.00836 | 0.83 | actin binding LIM protein 1 | ABLIM1 | 10q25 | 3983 |
| 204554_at | 0.00008 | 0.83 | protein phosphatase 1, regulatory subunit 3D | PPP1R3D | 20q13.3 | 5509 |
| 203708_at | 0.00027 | 0.83 | phosphodiesterase 4B, cAMP-specific | PDE4B | 1p31 | 5142 |
| 1552417_a_at | 0.00354 | 0.83 | neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1 | NEDD1 | 12q23.1 | 121441 |
| 206262_at | 0.00961 | 0.83 | alcohol dehydrogenase 1C (class I), gamma polypeptide | ADH1C | 4q23 | 126 |
| 233823_at | 0.00041 | 0.83 | family with sequence similarity 184, member B | FAM184B | 4p16 | 27146 |
| 238714_at | 0.00003 | 0.82 | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18 | TNFRSF18 | 1p36.3 | 8784 |
| 223608_at | 0.00005 | 0.82 | EF-hand calcium binding domain 2 | EFCAB2 | 1q44 | 84288 |
| 231597_x_at | 0.00667 | 0.82 | clone IMAGE:2047572 | | | |
| 220266_s_at | 0.00035 | 0.82 | Kruppel-like factor 4 (gut) | KLF4 | 9q31 | 9314 |
| 221841_s_at | 0.00546 | 0.82 | Kruppel-like factor 4 (gut) | KLF4 | 9q31 | 9314 |

| | | | | | | | | | | |
|--------------|---------|------|---|-----------------|----------|-----------|--|--|--|--|
| 236439_at | 0.00018 | 0.81 | B-cell CLL/lymphoma 6 | | | | | | | |
| 202149_at | 0.00091 | 0.80 | neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 | BCL6 | 3q27 | 604 | | | | |
| 243489_at | 0.00878 | 0.80 | clone IMAGE:3071288 | NEDD9 | 6p25-p24 | 4739 | | | | |
| 1562321_at | 0.01690 | 0.80 | pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4 | PDK4 | 7q21.3 | 5166 | | | | |
| 235412_at | 0.00027 | 0.80 | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7 | ARHGEF7 | 13q34 | 8874 | | | | |
| 1558048_x_at | 0.00009 | 0.80 | clone IMAGE:4523513 | | | | | | | |
| 201170_s_at | 0.00018 | 0.78 | basic helix-loop-helix family, member e40 | BHLHE40 | 3p26 | 8553 | | | | |
| 230494_at | 0.00147 | 0.78 | solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1 | SLC20A1 | 2q11-q14 | 6574 | | | | |
| 227318_at | 0.00075 | 0.77 | transmembrane protein 178B | TMEM178B | 7q34 | 100507421 | | | | |
| 234989_at | 0.00013 | 0.77 | nuclear paraspeckle assembly transcript 1 | NEAT1 | 11q13.1 | 693197 | | | | |
| 227062_at | 0.00014 | 0.77 | nuclear paraspeckle assembly transcript 1 | NEAT1 | 11q13.1 | 693197 | | | | |
| 205713_s_at | 0.00854 | 0.76 | cartilage oligomeric matrix protein | COMP | 19p13.1 | 1311 | | | | |
| 240244_at | 0.00256 | 0.75 | clone IMAGE:1622087 | | | | | | | |
| 208319_s_at | 0.00145 | 0.72 | RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3 | RBM3 | Xp11.2 | 5935 | | | | |
| 225239_at | 0.00001 | 0.71 | nuclear paraspeckle assembly transcript 1 | NEAT1 | 11q13.1 | 693197 | | | | |

ANNEXES ARTICLE 2 :

Fructose overfeeding in first-degree relatives of type 2 diabetic patients impacts energy metabolism and mitochondrial functions in skeletal muscle

Annexe 5 : Supplementary table 1: List of the 544 probe sets regulated in skeletal muscle after 7 days of HFrD

| Probe Set ID | p-value | Fold Change | Gene name | Gene Symbol | Chromosomal Location | LIID |
|--------------|----------|-------------|--|-----------------|----------------------|--------|
| 209596_at | 0.001480 | 2.707 | matrix-remodelling associated 5 | MXRA5 | chrXp22.33 | 25878 |
| 201694_s_at | 0.004350 | 2.098 | early growth response 1 | EGR1 | chr5q31.1 | 1958 |
| 201852_x_at | 0.000810 | 1.984 | collagen, type III, alpha 1 | COL3A1 | chr2q31 | 1281 |
| 215076_s_at | 0.001280 | 1.93 | collagen, type III, alpha 1 | COL3A1 | chr2q31 | 1281 |
| 212063_at | 0.001770 | 1.759 | CD44 molecule (Indian blood group) | CD44 | chr11p13 | 960 |
| 221730_at | 0.001470 | 1.745 | collagen, type V, alpha 2 | COL5A2 | chr2q14-q32 | 1290 |
| 223361_at | 0.002630 | 1.717 | chromosome 6 open reading frame 115 | C6orf115 | chr6q24.1 | 58527 |
| 209101_at | 0.004780 | 1.712 | connective tissue growth factor | CTGF | chr6q23.1 | 1490 |
| 207173_x_at | 0.007290 | 1.691 | cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast) | CDH11 | chr16q22.1 | 1009 |
| 217028_at | 0.003820 | 1.673 | chemokine (C-X-C motif) receptor 4 | CXCR4 | chr2q21 | 7852 |
| 217763_s_at | 0.009430 | 1.668 | RAB31, member RAS oncogene family | RAB31 | chr18p11.3 | 11031 |
| 202403_s_at | 0.001360 | 1.647 | collagen, type I, alpha 2 | COL1A2 | chr7q22.1 | 1278 |
| 204620_s_at | 0.003520 | 1.595 | versican | VCAN | chr5q14.3 | 1462 |
| 201744_s_at | 0.009220 | 1.568 | lumican | LUM | chr12q21.3-q22 | 4060 |
| 227628_at | 0.008650 | 1.562 | glutathione peroxidase 8 (putative) | GPX8 | chr5q11.2 | 493869 |
| 210764_s_at | 0.004960 | 1.558 | cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 | CYR61 | chr1p31-p22 | 3491 |
| 210495_x_at | 0.001130 | 1.555 | fibronectin 1 | FN1 | chr2q34 | 2335 |
| 212464_s_at | 0.002150 | 1.55 | fibronectin 1 | FN1 | chr2q34 | 2335 |
| 221731_x_at | 0.007990 | 1.537 | versican | VCAN | chr5q14.3 | 1462 |
| 216442_x_at | 0.001130 | 1.531 | fibronectin 1 | FN1 | chr2q34 | 2335 |
| 211719_x_at | 0.002690 | 1.513 | fibronectin 1 | FN1 | chr2q34 | 2335 |
| 232458_at | 0.008140 | 1.512 | Collagen, type III, alpha 1 | COL3A1 | chr2q31 | 1281 |
| 226818_at | 0.003420 | 1.51 | macrophage expressed 1 | MPEG1 | chr11q12.1 | 219972 |
| 203186_s_at | 0.007450 | 1.498 | S100 calcium binding protein A4 | S100A4 | chr1q21 | 6275 |
| 204114_at | 0.006990 | 1.487 | nidogen 2 (osteonidogen) | NID2 | chr14q21-q22 | 22795 |
| 210754_s_at | 0.005070 | 1.483 | v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog | LYN | chr8q13 | 4067 |
| 208659_at | 0.008600 | 1.481 | chloride intracellular channel 1 | CLIC1 | chr6p22.1-p21.2 | 1192 |
| 202068_s_at | 0.004720 | 1.475 | low density lipoprotein receptor | LDLR | chr19p13.3 | 3949 |

| | | | | | | | |
|-------------|----------|-------|---|-----------------|-----------------|--------|-----------|
| 220948_s_at | 0.008630 | 1.471 | ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 1 polypeptide | ATPIA1 | chr1p21 | 476 | 21 |
| 201438_at | 0.000033 | 1.467 | collagen, type VI, alpha 3 | COL6A3 | chr2q37 | 1293 | |
| 204912_at | 0.000341 | 1.46 | interleukin 10 receptor, alpha | IL10RA | chr11q23 | 3587 | |
| 227223_at | 0.001290 | 1.46 | --- | --- | --- | --- | |
| 204017_at | 0.004240 | 1.458 | KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 3 | KDELR3 | chr22q13.1 | 11015 | |
| 228875_at | 0.001130 | 1.457 | family with sequence similarity 162, member B | FAM162B | chr6q22.1 | 221303 | |
| 210757_x_at | 0.002100 | 1.439 | disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein | DAB2 | chr5p13 | 1601 | |
| 231735_s_at | 0.000515 | 1.434 | metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 | MALAT1 | chr11q13.1 | 378938 | |
| 223502_s_at | 0.002760 | 1.433 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b | TNFSF13B | chr13q32-q34 | 10673 | |
| 213428_s_at | 0.000062 | 1.43 | collagen, type VI, alpha 1 | COL6A1 | chr21q22.3 | 1291 | |
| 221039_s_at | 0.008450 | 1.425 | AtfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain 1 | ASAP1 | chr8q24.1-q24.2 | 50807 | |
| 212240_s_at | 0.004070 | 1.42 | phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha) | PIK3R1 | chr5q13.1 | 5295 | |
| 203477_at | 0.004520 | 1.416 | collagen, type XV, alpha 1 | COL15A1 | chr9q21-q22 | 1306 | |
| 235489_at | 0.000539 | 1.413 | ras homolog gene family, member J | RHOJ | chr14q23.2 | 57381 | |
| 201090_x_at | 0.001060 | 1.411 | tubulin, alpha 1b | TUBA1B | chr12q13.12 | 10376 | |
| 208966_x_at | 0.003950 | 1.405 | interferon, gamma-inducible protein 16 | IFI16 | chr1q22 | 3428 | |
| 204489_s_at | 0.008930 | 1.405 | CD4 molecule (Indian blood group) | CD44 | chr11p13 | 960 | |
| 206331_at | 0.009760 | 1.404 | calcitonin receptor-like | CALCRL | chr2q32.1 | 10203 | |
| 212639_x_at | 0.000709 | 1.403 | tubulin, alpha 1b | TUBA1B | chr12q13.12 | 10376 | |
| 227396_at | 0.002070 | 1.402 | protein tyrosine phosphatase, receptor type, J | PTPRJ | chr11p11.2 | 5795 | |
| 200968_s_at | 0.002510 | 1.399 | peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B) | PP1B | chr15q21-q22 | 5479 | |
| 209270_at | 0.000754 | 1.399 | laminin, beta 3 | LAMB3 | chr1q32 | 3914 | |
| 201505_at | 0.004970 | 1.397 | laminin, beta 1 | LAMB1 | chr7q22 | 3912 | |
| 230741_at | 0.003940 | 1.394 | --- | --- | --- | --- | |
| 213646_x_at | 0.000683 | 1.392 | tubulin, alpha 1b | TUBA1B | chr12q13.12 | 10376 | |
| 212364_at | 0.004570 | 1.388 | myosin IB | MYO1B | chr2q12-q34 | 4430 | |
| 203817_at | 0.001010 | 1.386 | guanylate cyclase 1, soluble, beta 3 | GUCCY1B3 | chr4q31.3-q33 | 2983 | |
| 212013_at | 0.002990 | 1.383 | peroxidase homolog (Drosophila) | PXDN | chr2p25 | 7837 | |
| 243824_at | 0.009225 | 1.38 | --- | --- | --- | --- | |
| 201294_s_at | 0.007650 | 1.377 | WD repeat and SOCS box-containing 1 | WSB1 | chr17q11.1 | 26118 | |
| 222162_s_at | 0.000865 | 1.376 | ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1 | ADAMTS1 | chr21q21.2 | 9510 | |
| 228793_at | 0.003940 | 1.372 | jumonji domain containing 1C | JMJD1C | chr10q21.3 | 221037 | |

| | | | | | | | |
|--------------|----------|-------|--|-----------|---------------|--------|-----|
| 206332_s_at | 0.006700 | 1.372 | interferon, gamma-inducible protein 16 | IFI16 | chr1q22 | 3428 | 22 |
| 200801_x_at | 0.004760 | 1.371 | actin, beta | ACTB | chr7p15-p12 | 60 | |
| 202308_at | 0.001210 | 1.367 | sterol regulatory element binding transcription factor 1 | SREBF1 | chr17p11.2 | 6720 | |
| 239519_at | 0.007460 | 1.367 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 201278_at | 0.002540 | 1.365 | disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein | DAB2 | chr5p13 | 1601 | |
| 207714_s_at | 0.003130 | 1.36 | serpin peptidase inhibitor, clade H (collagen binding protein 1) | SERPINH1 | chr11q13.5 | 871 | |
| 230836_at | 0.001060 | 1.359 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2,8-sialyltransferase 4 | ST8SIA4 | chr5q21 | 7903 | |
| 211072_x_at | 0.000845 | 1.354 | tubulin, alpha 1b | TUBA1B | chr12q13.12 | 10376 | |
| 208965_s_at | 0.004180 | 1.352 | interferon, gamma-inducible protein 16 | IFI16 | chr1q22 | 3428 | |
| 1558678_s_at | 0.003510 | 1.352 | metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 | MALAT1 | chr11q13.1 | 378938 | |
| 219449_s_at | 0.009060 | 1.352 | transmembrane protein 70 | TMEM70 | chr8q21.11 | 54968 | |
| 242500_at | 0.002770 | 1.348 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 213125_at | 0.004670 | 1.346 | olfactomedin-like 2B | OLFML2B | chr1q23.3 | 25903 | |
| 200644_at | 0.004420 | 1.342 | MARCKS-like 1 | MARCKSL1 | chr1p35.1 | 65108 | |
| 212320_at | 0.002730 | 1.341 | tubulin, beta | TUBB | chr6p21.33 | 203068 | |
| 223340_at | 0.000384 | 1.34 | atlastin GTPase 1 | ATL1 | chr14q22.1 | 51062 | |
| 242699_at | 0.008300 | 1.339 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 242725_at | 0.000260 | 1.339 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 202531_at | 0.004640 | 1.338 | interferon regulatory factor 1 | IRF1 | chr5q31.1 | 3659 | |
| 211058_x_at | 0.000787 | 1.338 | tubulin, alpha 1b | TUBA1B | chr12q13.12 | 10376 | |
| 225295_at | 0.003840 | 1.338 | solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10 | SLC39A10 | chr2q32.3 | 57181 | |
| 211714_x_at | 0.003680 | 1.338 | tubulin, beta | TUBB | chr6p21.33 | 203068 | |
| 221269_s_at | 0.000958 | 1.337 | SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 3 | SH3BGRL3 | chr1p35-p34.3 | 83442 | |
| 201506_at | 0.005130 | 1.335 | transforming growth factor, beta-induced, 68kDa | TGFB1 | chr5q31 | 7045 | |
| 222457_s_at | 0.007380 | 1.332 | LIM domain and actin binding 1 | LIMA1 | chr12q13 | 51474 | |
| 207265_s_at | 0.004210 | 1.331 | KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 3 | KDELRS3 | chr22q13.1 | 11015 | |
| 211750_x_at | 0.001580 | 1.33 | tubulin, alpha 1c | TUBA1C | chr12q12-q14 | 84790 | |
| 1566145_s_at | 0.007620 | 1.33 | hypothetical protein LOC644450 | LOC644450 | chr1q12 | 644450 | |
| 209251_x_at | 0.000963 | 1.328 | tubulin, alpha 1c | TUBA1C | chr12q12-q14 | 84790 | |
| 214043_at | 0.003630 | 1.327 | protein tyrosine phosphatase, receptor type, D | PTPRD | chr9p23-p24.3 | 5789 | |
| 220117_at | 0.002450 | 1.322 | zinc finger protein 385D | ZNF385D | chr3p24.3 | 79750 | |
| 233364_s_at | 0.007430 | 1.321 | --- | --- | --- | --- | --- |

| | | | | | | | |
|--------------|----------|-------|---|-----------------|---------------|--------|----|
| 201085_s_at | 0.001710 | 1.32 | SON DNA binding protein | SON | chr21q22.1- | 6651 | 22 |
| 214247_s_at | 0.002250 | 1.32 | dieckkopf homolog 3 (Xenopus laevis) | DKK3 | chr11p15.2 | 27122 | 22 |
| 206715_at | 0.004710 | 1.316 | transcription factor EC | TFFC | chr7q31.2 | 22797 | |
| 207072_at | 0.003030 | 1.314 | interleukin 18 receptor accessory protein | IL18RAP | chr2q12 | 8807 | |
| 226318_at | 0.003000 | 1.313 | transforming growth factor beta regulator 1 | TBRG1 | chr11q24.2 | 84897 | |
| 228731_at | 0.002650 | 1.313 | --- | --- | --- | --- | |
| 225656_at | 0.007640 | 1.312 | EF-hand domain (C-terminal) containing 1 | EFHC1 | chr6p12.3 | 114327 | |
| 1557065_at | 0.007060 | 1.307 | YLP motif containing 1 | YLPM1 | chr14q24.3 | 56252 | |
| 1555728_a_at | 0.006360 | 1.306 | membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4 | MS4A4A | chr11q12 | 51338 | |
| 209284_s_at | 0.000330 | 1.305 | family with sequence similarity 208, member A | FAM208A | chr3p14.3 | 23272 | |
| 213867_x_at | 0.007350 | 1.303 | actin, beta | ACTB | chr7p15-p12 | 60 | |
| 208003_s_at | 0.005740 | 1.301 | nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive | NFAT5 | chr16q22.1 | 10725 | |
| 201288_at | 0.004880 | 1.299 | Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta | ARHGDI B | chr12p12.3 | 397 | |
| 1561079_at | 0.002520 | 1.299 | ankyrin repeat domain 28 | ANKRD28 | chr3p25.1 | 23243 | |
| 201625_s_at | 0.009950 | 1.298 | insulin induced gene 1 | INSIG1 | chr7q36 | 3638 | |
| 227480_at | 0.008230 | 1.297 | sushi domain containing 2 | SUSD2 | chr22q11-q12 | 56241 | |
| 222976_s_at | 0.008900 | 1.296 | tropomyosin 3 | TPM3 | chr1q21.2 | 7170 | |
| 222379_at | 0.001540 | 1.291 | potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4 | KCNIE4 | chr2q36.3 | 23704 | |
| 207725_at | 0.007130 | 1.288 | POU class 4 homeobox 2 | POU4F2 | chr4q31.2 | 5458 | |
| 207177_at | 0.000978 | 1.285 | prostaglandin F receptor (FP) | PTGFR | chr1p31.1 | 5737 | |
| 206115_at | 0.003790 | 1.281 | early growth response 3 | EGR3 | chr8p23-p21 | 1960 | |
| 232932_at | 0.007370 | 1.279 | --- | --- | --- | --- | |
| 213142_x_at | 0.004820 | 1.275 | pigeon homolog (Drosophila) | PION | chr7q11.23 | 54103 | |
| 242652_at | 0.007910 | 1.275 | --- | --- | --- | --- | |
| 241353_s_at | 0.001110 | 1.275 | --- | --- | --- | --- | |
| 210510_s_at | 0.007020 | 1.271 | neurophilin 1 | NRP1 | chr10p12 | 8829 | |
| 200788_s_at | 0.005580 | 1.271 | phosphoprotein enriched in astrocytes 15 | PEA15 | chr1q21.1 | 8682 | |
| 242431_at | 0.008967 | 1.271 | --- | --- | --- | --- | |
| 235425_at | 0.008890 | 1.27 | shugoshin-like 2 (S. pombe) | SGOL2 | chr2q33.1 | 151246 | |
| 217164_at | 0.007820 | 1.269 | --- | --- | --- | --- | |
| 221942_s_at | 0.000578 | 1.269 | guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3 | GUCY1A3 | chr4q31.3-q33 | 2982 | |

| | | | | | | | |
|-------------|----------|-------|--|------------------|------------------|--------|----------|
| 208977_x_at | 0.007310 | 1.269 | tubulin, beta 2C | TUBB2C | chr9q34 | 10383 | 2 |
| 202273_at | 0.004220 | 1.269 | platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide | PDGFRB | chr5q31-q32 | 5159 | |
| 222819_at | 0.007370 | 1.268 | CTP synthase II | CTPS2 | chrXp22 | 56474 | |
| 232034_at | 0.001620 | 1.263 | long intergenic non-protein coding RNA 537 | LINC00537 | chr9q21.11 | 203274 | |
| 212956_at | 0.009860 | 1.262 | TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain) | TBC1D9 | chr4q31.21 | 23158 | |
| 1570153_at | 0.001090 | 1.261 | coiled-coil domain containing 169 | CCDC169 | chr13q13.3 | 728591 | |
| 232890_at | 0.005480 | 1.259 | --- | --- | --- | --- | |
| 231252_at | 0.000293 | 1.256 | KAT8 regulatory NSL complex subunit 1-like | KANSL1L | chr2q34 | 151050 | |
| 207686_s_at | 0.006910 | 1.256 | caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase | CASP8 | chr2q33-q34 | 841 | |
| 203276_at | 0.007460 | 1.254 | lamin B1 | LMNB1 | chr5q23.3-q31.1 | 4001 | |
| 208837_at | 0.001820 | 1.253 | transmembrane emp24 protein transport domain containing 3 | TMED3 | chr15q24-q25 | 23423 | |
| 217226_s_at | 0.005060 | 1.252 | sideroflexin 3 | SFXN3 | chr10q24.31 | 81855 | |
| 200989_at | 0.004680 | 1.251 | hypoxia inducible factor 1, alpha subunit | HIF1A | chr14q21-q24 | 3091 | |
| 225178_at | 0.004890 | 1.251 | tetratricopeptide repeat domain 14 | TTG14 | chr3q26.33 | 151613 | |
| 223204_at | 0.006870 | 1.251 | family with sequence similarity 198, member B | FAM198B | chr4q32.1 | 51313 | |
| 210665_at | 0.007540 | 1.248 | tissue factor pathway inhibitor | TFPI | chr2q32 | 7035 | |
| 213113_s_at | 0.000495 | 1.247 | solute carrier family 43, member 3 | SLC43A3 | chr11q11 | 29015 | |
| 225186_at | 0.001620 | 1.246 | Ras association (RalGDS/AF-6), pleckstrin homology domains 1 | RAPH1 | chr2q33 | 65059 | |
| 238987_at | 0.001650 | 1.246 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4-galactosyltransferase1 | B4GALT1 | chr9p13 | 2683 | |
| 224822_at | 0.006040 | 1.245 | deleted in liver cancer 1 | DLC1 | chr8p22 | 10395 | |
| 233626_at | 0.001150 | 1.243 | --- | --- | --- | --- | |
| 227607_at | 0.008610 | 1.242 | STAM binding protein-like 1 | STAMBPL1 | chr10q23.31 | 57559 | |
| 218780_at | 0.005320 | 1.242 | hook homolog 2 (Drosophila) | HOOK2 | chr19p13.2 | 29911 | |
| 205729_at | 0.001160 | 1.242 | oncostatin M receptor | OSMR | chr5p13.1 | 9180 | |
| 214038_at | 0.003950 | 1.242 | chemokine (C-C motif) ligand 8 | CCL8 | chr17q11.2 | 6355 | |
| 221765_at | 0.004740 | 1.24 | UDP-glucose ceramide glucosyltransferase | UGCG | chr9q31 | 7357 | |
| 210270_at | 0.002970 | 1.24 | regulator of G-protein signaling 6 | RGS6 | chr14q24.3 | 9628 | |
| 210762_s_at | 0.006790 | 1.237 | deleted in liver cancer 1 | DLC1 | chr8p22 | 10395 | |
| 230375_at | 0.009520 | 1.236 | PNN-interacting serine/arginine-rich protein | PNISR | chr6q16.3 | 25957 | |
| 214803_at | 0.007320 | 1.234 | cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney) | CDH6 | chr5p15.1-p14 | 1004 | |
| 213910_at | 0.002670 | 1.233 | insulin-like growth factor binding protein 7 | IGFBP7 | chr4q12 | 3490 | |
| 202637_s_at | 0.005680 | 1.231 | intercellular adhesion molecule 1 | ICAM1 | chr19p13.3-p13.2 | 3383 | |

| | | | | | | | |
|--------------|----------|-------|---|-----------------|------------------|-----------|----------------|
| 201584_s_at | 0.004160 | 1.227 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39 | DDX39 | chr19p13.12 | 10212 | ⁵ N |
| 235735_at | 0.003150 | 1.226 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 215992_s_at | 0.000534 | 1.226 | Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2 | RAPGEF2 | chr4q32.1 | 9693 | --- |
| 229388_at | 0.009520 | 1.222 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 232229_at | 0.001500 | 1.221 | senataxin | SETX | chr9q34.13 | 23064 | --- |
| 204829_s_at | 0.008870 | 1.219 | folate receptor 2 (fetal) | FOLR2 | chr11q13.3-q13.5 | 2350 | --- |
| 212382_at | 0.009660 | 1.219 | transcription factor 4 | TCF4 | chr18q21.1 | 6925 | --- |
| 236487_at | 0.007210 | 1.218 | sodium channel and clathrin linker 1 | SCLT1 | chr4q28.2 | 132320 | --- |
| 204639_at | 0.006230 | 1.217 | adenosine deaminase | ADA | chr20q12-q13.11 | 100 | --- |
| 1558173_a_at | 0.002910 | 1.217 | leucine zipper protein 1 | LUZP1 | chr1p36 | 7798 | --- |
| 209156_s_at | 0.001590 | 1.216 | collagen, type VI, alpha 2 | COL6A2 | chr21q22.3 | 1292 | --- |
| 203595_s_at | 0.007160 | 1.216 | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5 | IFIT5 | chr10q23.31 | 24138 | --- |
| 235056_at | 0.004950 | 1.215 | ets variant 6 | ETV6 | chr12p13 | 2120 | --- |
| 218473_s_at | 0.007160 | 1.215 | glycosyltransferase 25 domain containing 1 | GLT25D1 | chr19p13.11 | 79709 | --- |
| 1559140_at | 0.005420 | 1.21 | family with sequence similarity 87, member A | FAM87A | chr8p23.3 | 157693 | --- |
| 206070_s_at | 0.003440 | 1.207 | EPH receptor A3 | EPHA3 | chr3p11.2 | 2042 | --- |
| 239049_at | 0.007230 | 1.202 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 242467_at | 0.002500 | 1.201 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 228913_at | 0.006720 | 1.201 | TPT1 antisense RNA 1 (non-protein coding) | TPT1-AS1 | chr13q14.13 | 100190939 | --- |
| 242338_at | 0.008570 | 1.201 | transmembrane protein 64 | TMEM64 | chr8q21.3 | 169200 | --- |
| 233461_x_at | 0.007450 | 1.201 | zinc finger protein 226 | ZNF226 | chr19q13.2 | 7769 | --- |
| 222145_at | 0.003210 | 1.201 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 243008_at | 0.000640 | 1.2 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 213102_at | 0.007220 | 1.196 | ARP3 actin-related protein 3 homolog (yeast) | ACTR3 | chr2q14.1 | 10096 | --- |
| 1555074_a_at | 0.008450 | 1.196 | potassium voltage-gated channel, subfamily H member 5 | KCNH5 | chr14q23.1 | 27133 | --- |
| 202877_s_at | 0.001150 | 1.193 | CD93 molecule | CD93 | chr20p11.21 | 22918 | --- |
| 243683_at | 0.005070 | 1.193 | Mortality factor 4 like 2 | MORF4L2 | chrXq22 | 9643 | --- |
| 219572_at | 0.005140 | 1.191 | Ca++-dependent secretion activator 2 | CADPS2 | chr7q31.3 | 93664 | --- |
| 243907_at | 0.002250 | 1.191 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 214686_at | 0.006920 | 1.189 | zinc finger protein 266 | ZNF266 | chr19p13.2 | 10781 | --- |
| 1555912_at | 0.004620 | 1.189 | ST7 overlapping transcript 1 (non-protein coding) | ST7OT1 | chr7q31.1-q31.2 | 93653 | --- |
| 204688_at | 0.007900 | 1.188 | sarcoglycan, epsilon | SGCE | chr7q21-q22 | 8910 | --- |

| | | | | | | |
|-------------|----------|-------|---|--------------|-------------------|--------|
| 226812_at | 0.008800 | 1.144 | --- | --- | --- | 227 |
| 1558996_at | 0.009730 | 1.143 | forkhead box P1 | FOXP1 | chr3p14.1 | 27086 |
| 201716_at | 0.003590 | 1.142 | sorting nexin 1 | SNX1 | chr15q22.31 | 6642 |
| 244153_at | 0.001490 | 1.137 | zinc finger protein 207 | ZNF207 | chr17q11.2 | 7756 |
| 216254_at | 0.008640 | 1.133 | parvin, beta | PARVB | chr22q13.2-q13.33 | 29780 |
| 224759_s_at | 0.009640 | 1.133 | chromosome 12 open reading frame 23 | C12orf23 | chr12q23.3 | 90488 |
| 208663_s_at | 0.005320 | 1.115 | tetratricopeptide repeat domain 3 | TTC3 | chr21q22.2 | 7267 |
| 240692_at | 0.008340 | 0.904 | SPR pseudogene | MGC34796 | chr1p32 | 414927 |
| 204384_at | 0.009240 | 0.904 | golgin A2 | GOLGA2 | chr9q34.11 | 2801 |
| 205037_at | 0.008870 | 0.901 | intraflagellar transport 27 homolog (Chlamydomonas) | IFT27 | chr22q13.1 | 11020 |
| 1554047_at | 0.009870 | 0.901 | thioredoxin domain containing 9 | TXNDC9 | chr2q11.2 | 10190 |
| 226458_at | 0.007530 | 0.9 | --- | --- | --- | --- |
| 228562_at | 0.008460 | 0.899 | zinc finger and BTB domain containing 10 | ZBTB10 | chr8q13-q21.1 | 65986 |
| 222733_x_at | 0.005350 | 0.898 | ribosomal RNA processing 1 homolog (S. cerevisiae) | RRP1 | chr21q22.3 | 8568 |
| 231936_at | 0.009330 | 0.897 | homeobox C9 | HOXC9 | chr12q13.3 | 3225 |
| 224705_s_at | 0.005960 | 0.897 | trinucleotide repeat containing 6A | TNR6A | chr16p11.2 | 27327 |
| 232564_at | 0.009290 | 0.895 | solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 5 | SLC9A5 | chr16q22.1 | 6553 |
| 242839_at | 0.008630 | 0.892 | --- | --- | --- | --- |
| 208090_s_at | 0.009050 | 0.892 | autoimmune regulator | AIRE | chr21q22.3 | 326 |
| 228871_at | 0.009610 | 0.892 | --- | --- | --- | --- |
| 216043_x_at | 0.006190 | 0.892 | --- | --- | --- | --- |
| 234905_at | 0.008690 | 0.892 | hypothetical LOC26077 | DKFZP434H168 | chr16q12.2 | 26077 |
| 237861_at | 0.008750 | 0.891 | --- | --- | --- | --- |
| 202798_at | 0.007350 | 0.891 | SEC24 family, member B (S. cerevisiae) | SEC24B | chr4q25 | 10427 |
| 1554951_at | 0.007490 | 0.891 | --- | --- | --- | --- |
| 233652_at | 0.004590 | 0.891 | --- | --- | --- | --- |
| 230530_at | 0.008890 | 0.891 | --- | --- | --- | --- |
| 227990_at | 0.007800 | 0.89 | SLU7 splicing factor homolog (S. cerevisiae) | SLU7 | chr5q33.3 | 10569 |
| 226737_at | 0.004880 | 0.889 | solute carrier family 25, member 42 | SLC25A42 | chr19p13.11 | 284439 |
| 228084_at | 0.009870 | 0.889 | phospholipase A2, group X11A | PLA2G12A | chr4q25 | 81579 |
| 230393_at | 0.009240 | 0.889 | culin 5 | CUL5 | chr11q22-q23 | 8065 |
| 202942_at | 0.009020 | 0.889 | electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide | ETF8 | chr19q13.3 | 2109 |

| | | | | | | | |
|-------------|----------|-------|--|---------------------|-------------------|-----------|-----------|
| 214997_at | 0.006990 | 0.888 | suppressor of cancer cell invasion | SCAI | chr9q33.3 | 286205 | 28 |
| 227786_at | 0.007280 | 0.888 | mediator complex subunit 30 | MED30 | chr8q24.11 | 90390 | |
| 238102_s_at | 0.008900 | 0.888 | BTB (POZ) domain containing 19 | BTBD19 | chr1p34.1 | 149478 | |
| 244781_x_at | 0.007120 | 0.887 | --- | --- | --- | --- | |
| 214030_at | 0.004540 | 0.887 | beta-gamma crystallin domain containing 3 | CRYBG3 | chr3q11.2 | 131544 | |
| 232813_s_at | 0.005990 | 0.886 | golgin A6 family, member A | GOLGA6A | chr15q24.1 | 342096 | |
| 233570_at | 0.008130 | 0.885 | --- | --- | --- | --- | |
| 1553205_at | 0.004370 | 0.885 | chromosome 20 open reading frame 200 | C20orf200 | chr20q13.33 | 253868 | |
| 211700_s_at | 0.008520 | 0.884 | trophinin | TRO | chrXp11.22-p11.21 | 7216 | |
| 230034_x_at | 0.003960 | 0.884 | mitochondrial ribosomal protein L41 | MRPL41 | chr9q34.3 | 64975 | |
| 37872_at | 0.005730 | 0.884 | jerky homolog (mouse) | JRK | chr8q24.3 | 8629 | |
| 228225_at | 0.008460 | 0.884 | peroxisomal biogenesis factor 2 | PEX2 | chr8q21.1 | 5828 | |
| 227787_s_at | 0.004340 | 0.884 | mediator complex subunit 30 | MED30 | chr8q24.11 | 90390 | |
| 213591_at | 0.008550 | 0.882 | aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1 | ALDH7A1 | chr5q31 | 501 | |
| 215942_s_at | 0.008750 | 0.882 | G-2 and S-phase expressed 1 | GTSF1 | chr22q13.2-q13.3 | 51512 | |
| 204775_at | 0.009110 | 0.882 | chromatin assembly factor 1, subunit B (p60) | CHAF1B | chr21q22.13 | 8208 | |
| 221679_s_at | 0.009870 | 0.882 | abhydrolase domain containing 6 | ABHD6 | chr3p14.3 | 57406 | |
| 204469_at | 0.007910 | 0.881 | protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1 | PTPRZ1 | chr7q31.3 | 5803 | |
| 203524_s_at | 0.007841 | 0.881 | mercaptopyruvate sulfurtransferase | MPS1 | chr22q13.1 | 4357 | |
| 1560475_at | 0.009710 | 0.881 | hypothetical LOC100129455 | LOC100129455 | chr2q31.1 | 100129455 | |
| 222701_s_at | 0.008650 | 0.881 | coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 7 | CHCHD7 | chr8q12.1 | 79145 | |
| 200808_s_at | 0.006710 | 0.881 | zyxin | ZYX | chr7q32 | 7791 | |
| 240113_at | 0.007500 | 0.88 | --- | --- | --- | --- | |
| 223787_s_at | 0.007740 | 0.88 | chromosome 3 open reading frame 19 | C3orf19 | chr3p25.1 | 51244 | |
| 241380_at | 0.008090 | 0.879 | Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 37 | ARHGGEF37 | chr5q32 | 389337 | |
| 229448_at | 0.003840 | 0.879 | LAG1 homolog, ceramide synthase 1 | LASS1 | chr19p12 | 10715 | |
| 206624_at | 0.008170 | 0.879 | ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked | USP9Y | chrYq11.2 | 8287 | |
| 202734_at | 0.005200 | 0.879 | thyroid hormone receptor interactor 10 | TRIP10 | chr19p13.3 | 9322 | |
| 203221_at | 0.005660 | 0.879 | transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila) | TLE1 | chr9q21.32 | 7088 | |
| 223477_s_at | 0.008500 | 0.879 | chromosome 12 open reading frame 65 | C12orf65 | chr12q24.31 | 91574 | |
| 218534_s_at | 0.009280 | 0.878 | angiogenic factor with G patch and FHA domains 1 | AGGF1 | chr5q13.3 | 55109 | |
| 239483_at | 0.006520 | 0.878 | FLJ37035 protein /// hypothetical protein LOC100287412 | FLJ37035 | chr10q26.13 | 100287412 | |

| | | | | | | | |
|--------------|----------|-------|---|------------------|------------------|-----------|-----------|
| 1569905_at | 0.009960 | 0.878 | hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1-like | HSD11B1L | chr19p13.3 | 374875 | 21 |
| 1563019_at | 0.001310 | 0.877 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 225715_at | 0.006530 | 0.877 | regulatory associated protein of MTOR, complex 1 | RPTOR | chr17q25.3 | 57521 | --- |
| 243103_at | 0.003070 | 0.877 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 223331_s_at | 0.009850 | 0.877 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 20 | DDX20 | chr1p21.1-p13.2 | 11218 | --- |
| 208481_at | 0.007120 | 0.876 | ankyrin repeat and SOCS box-containing 4 | ASB4 | chr7q21-q22 | 51666 | --- |
| 224783_at | 0.009230 | 0.876 | family with sequence similarity 100, member B | FAM100B | chr17q25.1 | 283991 | --- |
| 1558345_a_at | 0.007660 | 0.876 | hypothetical gene supported by NM_194304 | LOC439911 | chr10q11.21 | 439911 | --- |
| 232016_at | 0.005560 | 0.876 | FANCD2/FANCL-associated nuclease 1 | FAN1 | chr15q13.2-q13.3 | 22909 | --- |
| 203389_at | 0.007280 | 0.875 | kinesin family member 3C | KIF3C | chr2p23 | 3797 | --- |
| 213529_at | 0.007210 | 0.875 | zinc finger protein 688 | ZNF688 | chr16p11.2 | 146542 | --- |
| 242104_at | 0.002740 | 0.875 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1552325_at | 0.006990 | 0.874 | coiled-coil domain containing 11 | CCDC11 | chr18q21.1 | 220136 | --- |
| 230939_at | 0.001410 | 0.874 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1566989_at | 0.007580 | 0.874 | AT rich interactive domain 1B (SWI1-like) | ARID1B | chr6q25.1 | 57492 | --- |
| 216712_at | 0.003040 | 0.873 | solute carrier family 25, member 30 | SLC25A30 | chr13q14.13 | 253512 | --- |
| 1568742_at | 0.003520 | 0.873 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 227031_at | 0.005170 | 0.873 | sorting nexin 13 | SNX13 | chr7p21.1 | 23161 | --- |
| 215718_s_at | 0.002540 | 0.873 | PHD finger protein 3 | PHF3 | chr6q12 | 23469 | --- |
| 217672_x_at | 0.008500 | 0.873 | eukaryotic translation initiation factor 1 | EIF1 | chr17q21.2 | 10209 | --- |
| 203855_at | 0.005770 | 0.872 | WD repeat domain 47 | WDR47 | chr1p13.3 | 22911 | --- |
| 228543_at | 0.005460 | 0.872 | cytochrome c oxidase assembly factor-like | PET117 | chr20p11.23 | 100303755 | --- |
| 201082_s_at | 0.002620 | 0.872 | dynactin 1 (p150, glued homolog, Drosophila) | DCTN1 | chr2p13 | 1639 | --- |
| 243022_at | 0.008970 | 0.872 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 235165_at | 0.006710 | 0.871 | par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C. elegans) | PAR6B | chr20q13.13 | 84612 | --- |
| 1556505_at | 0.008780 | 0.871 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 202194_at | 0.003830 | 0.871 | transmembrane emp24 protein transport domain containing 5 | TMED5 | chr1pter-q31.3 | 50999 | --- |
| 241393_at | 0.008340 | 0.871 | Intracisternal A particle-promoted polypeptide | IPP | chr1p34-p32 | 3652 | --- |
| 229775_s_at | 0.001980 | 0.87 | myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia | MLLT4 | chr6q27 | 4301 | --- |
| 236358_at | 0.003370 | 0.87 | --- | --- | --- | --- | --- |
| 200710_at | 0.006210 | 0.87 | acyl-CoA dehydrogenase, very long chain | ACADVL | chr17p13-p11 | 37 | --- |
| 1565577_s_at | 0.007190 | 0.87 | --- | --- | --- | --- | --- |

| | | | | | | | |
|--------------|----------|-------|--|-----------------|-------------------|--------|---|
| 213844_at | 0.002990 | 0.869 | homeobox A5 | HOXA5 | chr7p15-p14 | 3202 | 8 |
| 220992_s_at | 0.009870 | 0.869 | TRM1 tRNA methyltransferase 1-like | TRMT1L | chr1q25.2 | 81627 | |
| 238417_at | 0.008800 | 0.869 | phosphoglucosyltransferase 2-like 1 | PGM2L1 | chr11q13.4 | 283209 | |
| 233933_s_at | 0.009220 | 0.868 | OTU domain containing 5 | OTUD5 | chrXp11.23 | 55593 | |
| 222234_s_at | 0.005500 | 0.868 | dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 1 | DBNDD1 | chr16q24.3 | 79007 | |
| 244475_at | 0.006110 | 0.868 | --- | --- | --- | --- | |
| 201230_s_at | 0.007530 | 0.867 | ariadne homolog 2 (Drosophila) | ARIH2 | chr3p21.2-p21.3 | 10425 | |
| 202366_at | 0.003020 | 0.867 | acyl-CoA dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain | ACADS | chr12q22-qter | 35 | |
| 209833_at | 0.002070 | 0.867 | CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain | CRADD | chr12q21.33-q23.1 | 8738 | |
| 230672_at | 0.008500 | 0.867 | --- | --- | --- | --- | |
| 236903_at | 0.005850 | 0.867 | --- | --- | --- | --- | |
| 226682_at | 0.001450 | 0.867 | RAR-related orphan receptor A | RORA | chr15q22.2 | 6095 | |
| 214360_at | 0.007000 | 0.866 | SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator | SMARCA4 | chr19p13.2 | 6597 | |
| 66053_at | 0.004570 | 0.866 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2 | HNRNPUL2 | chr11q12.3 | 221092 | |
| 1552980_at | 0.003400 | 0.866 | hyaluronan synthase 3 | HAS3 | chr16q22.1 | 3038 | |
| 238824_at | 0.009600 | 0.866 | --- | --- | --- | --- | |
| 1565786_x_at | 0.005670 | 0.866 | uncharacterized LOC645566 | FLJ45482 | --- | 645566 | |
| 229553_at | 0.008090 | 0.866 | phosphoglucosyltransferase 2-like 1 | PGM2L1 | chr11q13.4 | 283209 | |
| 223675_s_at | 0.003620 | 0.865 | vezatin, adherens junctions transmembrane protein | VEZT | chr12q22 | 55591 | |
| 224172_at | 0.002920 | 0.865 | --- | --- | --- | --- | |
| 202034_x_at | 0.006950 | 0.864 | RB1-inducible coiled-coil 1 | RB1CC1 | chr8q11 | 9821 | |
| 216008_s_at | 0.003100 | 0.864 | ariadne homolog 2 (Drosophila) | ARIH2 | chr3p21.2-p21.3 | 10425 | |
| 226506_at | 0.004050 | 0.864 | thrombospondin, type I, domain containing 4 | THSD4 | chr15q23 | 79875 | |
| 227340_s_at | 0.008920 | 0.864 | RGM domain family, member B | RGMB | chr5q15 | 285704 | |
| 239960_x_at | 0.008210 | 0.864 | Lyrn7 homolog (mouse) | LYRM7 | chr5q23.3 | 90624 | |
| 228923_at | 0.004890 | 0.864 | S100 calcium binding protein A6 | S100A6 | chr1q21 | 6277 | |
| 213924_at | 0.003200 | 0.863 | Metallophosphoesterase 1 | MPEP1 | chr18p11.21 | 65258 | |
| 209513_s_at | 0.002030 | 0.863 | hydroxysteroid dehydrogenase like 2 | HSD12 | chr9q32 | 84263 | |
| 229741_at | 0.004440 | 0.863 | mitochondrial antiviral signaling protein | MAVS | chr20p13 | 57506 | |
| 231428_at | 0.000966 | 0.863 | --- | --- | --- | --- | |
| 214193_s_at | 0.002780 | 0.863 | digestive organ expansion factor homolog (zebrafish) | DIEXF | chr1q32.2 | 27042 | |
| 226055_at | 0.007380 | 0.862 | arrestin domain containing 2 | ARRDC2 | chr19p13.11 | 27106 | |

| | | | | | | | |
|--------------|----------|-------|--|---------------------|---------------|-----------|----|
| 209512_s_at | 0.003360 | 0.862 | hydroxysteroid dehydrogenase like 2 | HSD12 | chr9q32 | 84263 | 21 |
| 217861_s_at | 0.001830 | 0.862 | prolactin regulatory element binding | PREB | chr2p23.3 | 10113 | |
| 203222_s_at | 0.009250 | 0.861 | transducin-like enhancer of split 1 (E(spl) homolog, Drosophila) | TLE1 | chr9q21.32 | 7088 | |
| 219311_at | 0.009930 | 0.861 | centrosomal protein 76kDa | CEP76 | chr18p11.21 | 79959 | |
| 1556148_s_at | 0.004050 | 0.861 | Hypothetical protein LOC100287426 | LOC100287426 | chr3q25.33 | 100287426 | |
| 242194_at | 0.003870 | 0.861 | Cullin 4A | CUL4A | chr13q34 | 8451 | |
| 220089_at | 0.006350 | 0.86 | L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase | L2HGDH | chr14q21.3 | 79944 | |
| 208796_s_at | 0.009390 | 0.86 | cyclin G1 | CCNG1 | chr5q32-q34 | 900 | |
| 241497_at | 0.003021 | 0.86 | --- | --- | --- | --- | |
| 203347_s_at | 0.002850 | 0.86 | metal response element binding transcription factor 2 | MTF2 | chr1p22.1 | 22823 | |
| 218522_s_at | 0.007840 | 0.86 | microtubule-associated protein 15 | MAP15 | chr19p13.11 | 55201 | |
| 226002_at | 0.004610 | 0.86 | GRB2-associated binding protein 1 | GAB1 | chr4q31.21 | 2549 | |
| 241610_x_at | 0.003650 | 0.86 | --- | --- | --- | --- | |
| 225516_at | 0.006230 | 0.86 | solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter) | SLC7A2 | chr8p22-p21.3 | 6542 | |
| 1558522_at | 0.006110 | 0.86 | --- | --- | --- | --- | |
| 226220_at | 0.006610 | 0.86 | Methyltransferase like 9 | METTL9 | chr16p13-p12 | 51108 | |
| 230211_at | 0.005680 | 0.86 | --- | --- | --- | --- | |
| 213758_at | 0.006680 | 0.86 | cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1 | COX4I1 | chr16q22-qter | 1327 | |
| 220056_at | 0.008690 | 0.86 | interleukin 22 receptor, alpha 1 | IL22RA1 | chr1p36.11 | 58985 | |
| 220929_at | 0.005540 | 0.859 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine (GalNAc-T8) | GALNT8 | chr12p13.3 | 26290 | |
| 227094_at | 0.007760 | 0.859 | dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1 | DHTKD1 | chr10p14 | 55526 | |
| 219451_at | 0.002500 | 0.859 | methionine sulfoxide reductase B2 | MSRB2 | chr10p12 | 22921 | |
| 234520_at | 0.002320 | 0.859 | --- | --- | --- | --- | |
| 203767_s_at | 0.003000 | 0.858 | steroid sulfatase (microsomal), isozyme S | STS | chrXp22.32 | 412 | |
| 212641_at | 0.003770 | 0.858 | human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 2 | HIVEP2 | chr6q23-q24 | 3097 | |
| 204554_at | 0.006030 | 0.858 | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3D | PPP1R3D | chr20q13.3 | 5509 | |
| 224051_at | 0.001450 | 0.858 | --- | --- | --- | --- | |
| 235768_at | 0.006270 | 0.858 | SH3 domain containing ring finger 2 | SH3RF2 | chr5q32 | 153769 | |
| 219044_at | 0.006680 | 0.857 | threonine synthase-like 2 (S. cerevisiae) | THNSL2 | chr2p11.2 | 55258 | |
| 214033_at | 0.007400 | 0.857 | ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6 | ABCC6 | chr16p13.1 | 368 | |
| 235475_at | 0.004370 | 0.857 | Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 | SERP1 | chr3q25.1 | 27230 | |
| 207501_s_at | 0.001210 | 0.856 | fibroblast growth factor 12 | FGF12 | chr3q28 | 2257 | |

| | | | | | | | |
|-------------|----------|-------|--|------------------|--------------------|--------|----|
| 225890_at | 0.006307 | 0.855 | chromosome 20 open reading frame 72 | C20orf72 | chr20p11.23 | 92667 | 23 |
| 212308_at | 0.002470 | 0.855 | cytoplasmic linker associated protein 2 | CLASP2 | chr3p22.3 | 23122 | |
| 219294_at | 0.003540 | 0.855 | centromere protein Q | CENPQ | chr6p12.3 | 55166 | |
| 213304_at | 0.001860 | 0.855 | family with sequence similarity 179, member B | FAM179B | chr14q21.2 | 23116 | |
| 238793_at | 0.009470 | 0.854 | tigger transposable element derived 7 | TIGD7 | chr16p13.3 | 91151 | |
| 240806_at | 0.003040 | 0.854 | Ribosomal protein L15 | RPL15 | chr3p24.2 | 6138 | |
| 214392_at | 0.006050 | 0.853 | immunity-related GTPase family, cinema | IRGC | chr19q13.31 | 56269 | |
| 217882_at | 0.006010 | 0.853 | transmembrane protein 111 | TMEM111 | chr3p25.3 | 55831 | |
| 208208_at | 0.003230 | 0.853 | myosin, heavy chain 13, skeletal muscle | MYH13 | chr17p13 | 8735 | |
| 222120_at | 0.002620 | 0.853 | zinc finger protein 764 | ZNF764 | chr16p11.2 | 92595 | |
| 236828_at | 0.008940 | 0.852 | --- | --- | --- | --- | |
| 205510_s_at | 0.008140 | 0.852 | hypothetical protein FLJ10038 | FLJ10038 | chr15q21.2 | 55056 | |
| 214260_at | 0.004680 | 0.852 | COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 8 | COPS8 | chr2q37.3 | 10920 | |
| 205862_at | 0.002120 | 0.852 | growth regulation by estrogen in breast cancer 1 | GREB1 | chr2p25.1 | 9687 | |
| 33494_at | 0.008360 | 0.851 | electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase | ETFDH | chr4q32-q35 | 2110 | |
| 200646_s_at | 0.005280 | 0.851 | nucleobindin 1 | NUCB1 | chr19q13.2-q13.4 | 4924 | |
| 239664_at | 0.004250 | 0.851 | --- | --- | --- | --- | |
| 200789_at | 0.002170 | 0.851 | enoyl CoA hydratase 1, peroxisomal | ECH1 | chr19q13.1 | 1891 | |
| 206355_at | 0.001990 | 0.851 | guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating | GNAL | chr18p11.22-p11.21 | 2774 | |
| 1561004_at | 0.006020 | 0.851 | --- | --- | --- | --- | |
| 227842_at | 0.003310 | 0.851 | RAB30, member RAS oncogene family | RAB30 | chr11q12-q14 | 27314 | |
| 227605_at | 0.002910 | 0.851 | aminoacyl tRNA synthetase multifunctional protein 1 | AIMP1 | chr4q24 | 9255 | |
| 1553864_at | 0.009620 | 0.85 | G protein-coupled receptor 26 | GPR26 | chr10q26.13 | 2849 | |
| 229114_at | 0.006390 | 0.85 | GRB2-associated binding protein 1 | GAB1 | chr4q31.21 | 2549 | |
| 240020_at | 0.003220 | 0.85 | --- | --- | --- | --- | |
| 222243_s_at | 0.002420 | 0.849 | transducer of ERBB2, 2 | TOB2 | chr22q13.2-q13.31 | 10766 | |
| 232340_at | 0.007280 | 0.849 | hypothetical LOC388889 | LOC388889 | chr22q12.1 | 388889 | |
| 228284_at | 0.006170 | 0.849 | transducin-like enhancer of split 1 (E(spl) homolog, Drosophila) | TLE1 | chr9q21.32 | 7088 | |
| 228775_at | 0.004500 | 0.849 | transmembrane protein 111 | TMEM111 | chr3p25.3 | 55831 | |
| 222758_s_at | 0.006920 | 0.848 | transmembrane protein 132A | TMEM132A | chr11q12.2 | 54972 | |
| 210552_s_at | 0.001990 | 0.848 | Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 1 | RALGPS1 | chr9q33.3 | 9649 | |
| 244416_at | 0.003370 | 0.846 | tetratricopeptide repeat domain 17 | TTCl7 | chr11p12-p11.2 | 55761 | |

| | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------|-------|---|---------------|-------------------|-----------|-----------|--|--|--|--|--|
| 1555868_at | 0.001530 | 0.846 | --- | | | | | | | | | |
| 222204_s_at | 0.000536 | 0.846 | RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog | RRN3 | chr16p12 | 54700 | 54700 | | | | | |
| 225313_at | 0.001220 | 0.845 | family with sequence similarity 217, member B | FAM217B | chr20q13.2-q13.33 | 63939 | 63939 | | | | | |
| 232523_at | 0.006720 | 0.845 | multiple EGF-like-domains 10 | MEGF10 | chr5q33 | 84466 | 84466 | | | | | |
| 235344_at | 0.009998 | 0.845 | protein phosphatase, Mg2+/Mn2+ dependent, 1A | PPM1A | chr14q23.1 | 5494 | 5494 | | | | | |
| 1559926_at | 0.007660 | 0.845 | hypothetical protein LOC728353 | LOC728353 | chr14q11.2 | 728353 | 728353 | | | | | |
| 219901_at | 0.003220 | 0.845 | FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6 | FGD6 | chr12q22 | 55785 | 55785 | | | | | |
| 203387_s_at | 0.004210 | 0.844 | TBC1 domain family, member 4 | TBC1D4 | chr13q22.2 | 9882 | 9882 | | | | | |
| 237721_s_at | 0.006590 | 0.844 | ankyrin repeat and SOCS box-containing 4 | ASB4 | chr7q21-q22 | 51666 | 51666 | | | | | |
| 228469_at | 0.006590 | 0.842 | Peptidylprolyl isomerase D | PPID | chr4q31.3 | 5481 | 5481 | | | | | |
| 204577_s_at | 0.002580 | 0.842 | clusterin associated protein 1 | CLUAP1 | chr16p13.3 | 23059 | 23059 | | | | | |
| 204340_at | 0.003060 | 0.842 | transmembrane protein 187 | TMEM187 | chrXq28 | 8269 | 8269 | | | | | |
| 234937_x_at | 0.005560 | 0.841 | zinc finger protein 28 homolog (mouse) | ZFP28 | --- | 140612 | 140612 | | | | | |
| 235183_at | 0.005310 | 0.841 | --- | --- | --- | --- | --- | | | | | |
| 227511_at | 0.002720 | 0.841 | Sterile alpha motif domain containing 4B | SAMD4B | chr19q13.2 | 55095 | 55095 | | | | | |
| 235521_at | 0.000960 | 0.841 | homeobox A3 | HOXA3 | chr7p15-p14 | 3200 | 3200 | | | | | |
| 243459_x_at | 0.005760 | 0.841 | --- | --- | --- | --- | --- | | | | | |
| 240757_at | 0.007300 | 0.841 | Cytoplasmic linker associated protein 1 | CLASP1 | chr2q14.2-q14.3 | 23332 | 23332 | | | | | |
| 236023_at | 0.005980 | 0.84 | cyclin-dependent kinase 9 | CDK9 | chr9q34.1 | 1025 | 1025 | | | | | |
| 201007_at | 0.000841 | 0.84 | hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (trifunctional protein), beta subunit | HADHB | chr2p23 | 3032 | 3032 | | | | | |
| 230115_at | 0.004850 | 0.84 | hypothetical DKFZp779M0652 | DKFZp779M0652 | chr11p11.2 | 374387 | 374387 | | | | | |
| 231781_s_at | 0.004790 | 0.84 | leucine rich repeat containing 2 | LRRC2 | chr3p21.31 | 79442 | 79442 | | | | | |
| 1569996_at | 0.008380 | 0.84 | ankyrin repeat domain 26 pseudogene 3 | ANKRD26P3 | chr13q12.11 | 100101938 | 100101938 | | | | | |
| 227813_at | 0.009310 | 0.839 | THAP domain containing 6 | THAP6 | chr4q21.1 | 152815 | 152815 | | | | | |
| 242863_at | 0.000940 | 0.839 | --- | --- | --- | --- | --- | | | | | |
| 229256_at | 0.002060 | 0.839 | phosphoglucomutase 2-like 1 | PGM2L1 | chr11q13.4 | 283209 | 283209 | | | | | |
| 229212_at | 0.004980 | 0.838 | --- | --- | --- | --- | --- | | | | | |
| 211751_at | 0.005560 | 0.838 | phosphodiesterase 4D interacting protein | PDE4DIP | chr1q12 | 9659 | 9659 | | | | | |
| 203126_at | 0.002230 | 0.837 | inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2 | IMPA2 | chr18p11.2 | 3613 | 3613 | | | | | |
| 220305_at | 0.006640 | 0.836 | mitochondrial antiviral signaling protein | MAVS | chr20p13 | 57506 | 57506 | | | | | |
| 1556122_at | 0.001600 | 0.835 | --- | --- | --- | --- | --- | | | | | |
| 229999_at | 0.001970 | 0.835 | RAB28, member RAS oncogene family pseudogene | LOC10012841 | chrXq26.3 | 100128416 | 100128416 | | | | | |

| | | | | | | | |
|-------------|----------|-------|--|---------------------|--------------------|-----------|----|
| 204263_s_at | 0.003710 | 0.835 | carnitine palmitoyltransferase 2 | CPT2 | chr1p32 | 1376 | 28 |
| 213186_at | 0.000401 | 0.833 | DAZ interacting protein 3, zinc finger | DZIP3 | chr3q13.13 | 9666 | |
| 1553311_at | 0.008830 | 0.833 | chromosome 20 open reading frame 197 | C20orf197 | chr20q13.33 | 284756 | |
| 229685_at | 0.005100 | 0.833 | hypothetical LOC100134937 | LOC100134937 | --- | 100134937 | |
| 201848_s_at | 0.001270 | 0.832 | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 | BNIP3 | chr10q26.3 | 664 | |
| 226268_at | 0.006930 | 0.832 | RAB21, member RAS oncogene family | RAB21 | chr12q21.1 | 23011 | |
| 230598_at | 0.005380 | 0.832 | --- | --- | --- | --- | |
| 227239_at | 0.006360 | 0.831 | family with sequence similarity 126, member A | FAM126A | chr7p15.3 | 84668 | |
| 224325_at | 0.002080 | 0.831 | frizzled homolog 8 (Drosophila) | FZD8 | chr10p11.21 | 8325 | |
| 230900_at | 0.004590 | 0.829 | coiled-coil domain containing 110 | CCDC110 | chr4q35.1 | 256309 | |
| 235619_at | 0.003500 | 0.829 | hypothetical protein LOC285986 | LOC285986 | chr7q21.3 | 285986 | |
| 229718_at | 0.001310 | 0.829 | NEDD4 binding protein 2-like 1 | N4BP2L1 | chr13q12-q13 | 90634 | |
| 214204_at | 0.004240 | 0.828 | PARK2 co-regulated | PACRG | chr6q26 | 135138 | |
| 235129_at | 0.003940 | 0.827 | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 1A | PPP1R1A | chr12q13.2 | 5502 | |
| 1558474_at | 0.006150 | 0.827 | --- | --- | --- | --- | |
| 206815_at | 0.000544 | 0.827 | sperm associated antigen 8 | SPAG8 | chr9p13.3 | 26206 | |
| 224756_s_at | 0.001360 | 0.826 | HLA-B associated transcript 5 | BAT5 | chr6p21.3 | 7920 | |
| 217581_at | 0.003090 | 0.825 | --- | --- | --- | --- | |
| 206356_s_at | 0.000688 | 0.825 | guanine nucleotide binding protein (G protein) | GNAL | chr18p11.22-p11.21 | 2774 | |
| 209922_at | 0.002360 | 0.825 | BRCA1 associated protein | BRAP | chr12q24 | 8315 | |
| 231085_s_at | 0.001510 | 0.824 | --- | --- | --- | --- | |
| 212779_at | 0.000745 | 0.824 | KIAA1109 | KIAA1109 | chr4q27 | 84162 | |
| 235744_at | 0.006950 | 0.824 | PTC7 protein phosphatase homolog (S. cerevisiae) | PPTC7 | chr12q24.11 | 160760 | |
| 228621_at | 0.002920 | 0.823 | hemochromatosis type 2 (juvenile) | HFE2 | chr1q21.1 | 148738 | |
| 236665_at | 0.004680 | 0.823 | coiled-coil domain containing 18 | CCDC18 | chr1p22.1 | 343099 | |
| 231215_at | 0.001020 | 0.823 | --- | --- | --- | --- | |
| 208148_at | 0.004770 | 0.822 | myosin, heavy chain 4, skeletal muscle | MYH4 | chr17p13.1 | 4622 | |
| 217540_at | 0.000245 | 0.822 | family with sequence similarity 55, member C | FAM55C | chr3q12.3 | 91775 | |
| 202003_s_at | 0.000245 | 0.821 | acetyl-CoA acyltransferase 2 | ACAA2 | chr18q21.1 | 10449 | |
| 211562_s_at | 0.002940 | 0.82 | leiomodlin 1 (smooth muscle) | LMOD1 | chr1q32 | 25802 | |
| 228214_at | 0.002260 | 0.82 | SRV (sex determining region Y)-box 6 | SOX6 | chr11p15.3 | 55553 | |
| 240015_at | 0.009840 | 0.82 | --- | --- | --- | --- | |

| | | | | | | | |
|-------------|----------|-------|--|-----------------|------------------|--------|---|
| 205222_at | 0.008312 | 0.82 | enoyl-CoA, hydratase/3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase | EHHADH | chr3q26.3-q28 | 1962 | 5 |
| 203766_s_at | 0.000233 | 0.818 | leiomodlin 1 (smooth muscle) | LMOD1 | chr1q32 | 25802 | |
| 214493_s_at | 0.001050 | 0.818 | Inad-like (Drosophila) | INADL | chr1p31.3 | 10207 | |
| 244121_at | 0.002480 | 0.818 | Ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 3 (putative) | UBR3 | chr2q31.1 | 130507 | |
| 224835_at | 0.002270 | 0.817 | glycerophosphocholine phosphodiesterase GDEF1 homolog | GPCPD1 | chr20p12.3 | 56261 | |
| 233020_at | 0.000990 | 0.816 | --- | --- | --- | --- | |
| 206030_at | 0.000704 | 0.815 | aspartoacylase (Canavan disease) | ASPA | chr17pter-p13 | 443 | |
| 1559376_at | 0.001150 | 0.814 | ATP1A1 opposite strand | ATP1A1OS | chr1p13.1 | 84852 | |
| 212272_at | 0.005620 | 0.814 | lipin 1 | LPIN1 | chr2p25.1 | 23175 | |
| 208631_s_at | 0.000330 | 0.813 | hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (trifunctional protein), alpha subunit | HADHA | chr2p23 | 3030 | |
| 221539_at | 0.000440 | 0.813 | eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1 | EIF4EBP1 | chr8p12 | 1978 | |
| 236935_at | 0.002800 | 0.812 | protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 4 | PTPN4 | chr2q14.2 | 5775 | |
| 201849_at | 0.000181 | 0.811 | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 | BNIP3 | chr10q26.3 | 664 | |
| 236461_at | 0.000200 | 0.811 | abhydrolase domain containing 1 | ABHD1 | chr2p23.3 | 84696 | |
| 230492_s_at | 0.000597 | 0.81 | glycerophosphocholine phosphodiesterase GDEF1 homolog | GPCPD1 | chr20p12.3 | 56261 | |
| 241114_s_at | 0.000859 | 0.81 | --- | --- | --- | --- | |
| 207327_at | 0.001530 | 0.81 | eyes absent homolog 4 (Drosophila) | EYA4 | chr6q23 | 2070 | |
| 1556325_at | 0.003250 | 0.809 | filamin A interacting protein 1 | FILIP1 | chr6q14.1 | 27145 | |
| 208630_at | 0.000032 | 0.805 | hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (trifunctional protein), alpha subunit | HADHA | chr2p23 | 3030 | |
| 231925_at | 0.003640 | 0.802 | --- | --- | --- | --- | |
| 236772_s_at | 0.000883 | 0.802 | --- | --- | --- | --- | |
| 231903_x_at | 0.000596 | 0.801 | Rho GTPase activating protein 23 | ARHGAP23 | chr17q12 | 57636 | |
| 209409_at | 0.003580 | 0.799 | growth factor receptor-bound protein 10 | GRB10 | chr7p12-p11.2 | 2887 | |
| 244546_at | 0.005850 | 0.797 | cytochrome c, somatic | CYCS | chr7p15.3 | 54205 | |
| 243582_at | 0.002930 | 0.794 | SH3 domain containing ring finger 2 | SH3RF2 | chr5q32 | 153769 | |
| 221643_s_at | 0.001840 | 0.791 | arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats | RERE | chr1p36.2-p36.1 | 473 | |
| 1554438_at | 0.003620 | 0.791 | KIAA1217 | KIAA1217 | chr10p12.2-p12.1 | 56243 | |
| 238451_at | 0.000823 | 0.789 | membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55, 7) | MPP7 | chr10p12.1 | 143098 | |
| 224826_at | 0.000581 | 0.788 | glycerophosphocholine phosphodiesterase GDEF1 homolog | GPCPD1 | chr20p12.3 | 56261 | |
| 203991_s_at | 0.000074 | 0.787 | lysine (K)-specific demethylase 6A | KDM6A | chrXp11.2 | 7403 | |
| 226014_at | 0.001040 | 0.787 | Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit F | EIF3F | chr11p15.4 | 8665 | |
| 212276_at | 0.000008 | 0.787 | lipin 1 | LPIN1 | chr2p25.1 | 23175 | |

| | | | | | | | | | | |
|--------------|----------|-------|--|------------------------|------------------|--------|--|--|--|--|
| 212274_at | 0.000016 | 0.786 | lipin 1 | | | | | | | |
| 205738_s_at | 0.000410 | 0.785 | fatty acid binding protein 3, muscle and heart | | | | | | | |
| 1555345_at | 0.000142 | 0.784 | solute carrier family 38, member 4 | FABP3 | chr1p33-p32 | 2170 | | | | |
| 204264_at | 0.000727 | 0.784 | carnitine palmitoyltransferase 2 | SLC38A4 | chr12q13 | 55089 | | | | |
| 228892_at | 0.002520 | 0.784 | SH3 domain containing ring finger 2 | CPT2 | chr1p32 | 1376 | | | | |
| 226649_at | 0.001920 | 0.783 | pantothenate kinase 1 | SH3RF2 | chr5q32 | 153769 | | | | |
| 231051_at | 0.001160 | 0.778 | --- | PANK1 | chr10q23.31 | 53354 | | | | |
| 214919_s_at | 0.000217 | 0.776 | ANKHD1-EIF4EBP3 readthrough | --- | --- | --- | | | | |
| 236140_at | 0.000675 | 0.769 | glutamate-cysteine ligase, modifier subunit | ANKHD1-EIF4EBP3 | chr5q31.3 | 404734 | | | | |
| 207626_s_at | 0.000713 | 0.766 | solute carrier family 7, member 2 | GCLM | chr1p22.1 | 2730 | | | | |
| 206289_at | 0.000033 | 0.763 | homeobox A4 | SLC7A2 | chr8p22-p21.3 | 6542 | | | | |
| 207558_s_at | 0.000217 | 0.763 | paired-like homeodomain 2 | HOXA4 | chr7p15-p14 | 3201 | | | | |
| 240615_at | 0.000969 | 0.763 | --- | PITX2 | chr4q25-q27 | 5308 | | | | |
| 210999_s_at | 0.004210 | 0.759 | growth factor receptor-bound protein 10 | --- | --- | --- | | | | |
| 1556123_a_at | 0.000440 | 0.757 | --- | GRB10 | chr7p12-p11.2 | 2887 | | | | |
| 214285_at | 0.000506 | 0.756 | fatty acid binding protein 3, muscle and heart | --- | --- | --- | | | | |
| 225081_s_at | 0.000402 | 0.755 | cell division cycle associated 7-like | FABP3 | chr1p33-p32 | 2170 | | | | |
| 203658_at | 0.000005 | 0.752 | solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase)20 | CDC47L | chr7p15.3 | 55536 | | | | |
| 210069_at | 0.000317 | 0.747 | carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle) | SLC25A20 | chr3p21.31 | 788 | | | | |
| 235924_at | 0.000483 | 0.744 | --- | CPT1B | chr22q13.33 | 386593 | | | | |
| 210070_s_at | 0.000355 | 0.743 | carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle) | --- | --- | --- | | | | |
| 243863_at | 0.000011 | 0.743 | zinc finger, CW type with PWWP domain 2 | CPT1B | chr22q13.33 | 386593 | | | | |
| 213199_at | 0.000088 | 0.739 | C2 calcium-dependent domain containing 3 | ZCWPW2 | chr3p24.1 | 152098 | | | | |
| 238625_at | 0.002000 | 0.738 | chromosome 1 open reading frame 168 | C2CD3 | chr11q13.4 | 26005 | | | | |
| 219827_at | 0.000512 | 0.733 | uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier) | C1orf168 | chr1p32.2 | 199920 | | | | |
| 209410_s_at | 0.001150 | 0.726 | growth factor receptor-bound protein 10 | UCP3 | chr11q13 | 7352 | | | | |
| 241368_at | 0.000217 | 0.719 | perilipin 5 | GRB10 | chr7p12-p11.2 | 2887 | | | | |
| 238778_at | 0.000004 | 0.718 | membrane protein, palmitoylated 7 | PLIN5 | chr19p13.3 | 440503 | | | | |
| 203824_at | 0.000096 | 0.715 | tetraspanin 8 | MPP7 | chr10p12.1 | 143098 | | | | |
| 219643_at | 0.000145 | 0.71 | low density lipoprotein receptor-related protein 1B | TSPAN8 | chr12q14.1-q21.1 | 7103 | | | | |
| 207349_s_at | 0.000885 | 0.701 | uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier) | LRP1B | chr2q21.2 | 53353 | | | | |
| 220786_s_at | 0.000029 | 0.652 | solute carrier family 38, member 4 | UCP3 | chr11q13 | 7352 | | | | |
| | | | | SLC38A4 | chr12q13 | 55089 | | | | |

| | | | | | | | |
|--------------|----------|-------|---|-----------------|-------------|--------|-----|
| 218869_at | 0.000000 | 0.611 | malonyl-CoA decarboxylase | MLYCD | chr16q24 | 23417 | 237 |
| 204607_at | 0.001540 | 0.506 | 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial) | HMGCS2 | chr1p13-p12 | 3158 | |
| 1559977_a_at | 0.000004 | 0.479 | solute carrier family 25, member 34 | SLC25A34 | chr1p36.21 | 284723 | |
| 232245_at | 0.000001 | 0.454 | solute carrier family 25, member 34 | SLC25A34 | chr1p36.21 | 284723 | |

Annexe 6 : Supplementary table 2: List of the 100 most co-regulated genes associated with CPT1B, MYLCD and HADHA expression.

| Gene | Score | Description |
|-----------|-------|--|
| HADHA | | hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase (trifunctional protein), alpha subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:4801] |
| CPT1B | | carnitine palmitoyltransferase 1B (muscle) [Source:HGNC Symbol;Acc:2329] |
| MYLCD | | malonyl-CoA decarboxylase [Source:HGNC Symbol;Acc:7150] |
| NENF | 0.73 | neudesin neurotrophic factor [Source:HGNC Symbol;Acc:30384] |
| KIAA0319L | 0.69 | KIAA0319-like [Source:HGNC Symbol;Acc:30071] |
| DNAJC11 | 0.64 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 11 [Source:HGNC Symbol;Acc:25570] |
| KMT2C | 0.64 | lysine (K)-specific methyltransferase 2C [Source:HGNC Symbol;Acc:13726] |
| LLGL1 | 0.64 | lethal giant larvae homolog 1 (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:6628] |
| CCDC141 | 0.63 | coiled-coil domain containing 141 [Source:HGNC Symbol;Acc:26821] |
| TAF4B | 0.55 | TAF4b RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 105kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:11538] |
| TOMM22 | 0.52 | translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast) [Source:HGNC Symbol;Acc:18002] |
| ZNF12 | 0.49 | zinc finger protein 12 [Source:HGNC Symbol;Acc:12902] |
| ZBED6 | 0.49 | zinc finger, BED-type containing 6 [Source:HGNC Symbol;Acc:33273] |
| FANCF | 0.48 | Fanconi anemia, complementation group F [Source:HGNC Symbol;Acc:3587] |
| FOXO3 | 0.47 | forkhead box O3 [Source:HGNC Symbol;Acc:3821] |
| RMND1 | 0.47 | required for meiotic nuclear division 1 homolog (S. cerevisiae) [Source:HGNC Symbol;Acc:21176] |
| KANSL3 | 0.47 | KAT8 regulatory NSL complex subunit 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:25473] |
| ZNF200 | 0.47 | zinc finger protein 200 [Source:HGNC Symbol;Acc:12993] |
| NRG1 | 0.47 | neuregulin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:7997] |
| HPCAL1 | 0.47 | hippocalcin-like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:5145] |
| MAPKAPK5 | 0.46 | mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:6889] |
| PET100 | 0.45 | PET100 homolog (S. cerevisiae) [Source:HGNC Symbol;Acc:40038] |
| NDST1 | 0.45 | N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:7680] |
| ZDHHC11 | 0.45 | zinc finger, DHHC-type containing 11 [Source:HGNC Symbol;Acc:19158] |
| PPARA | 0.45 | peroxisome proliferator-activated receptor alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:9232] |
| ANK1 | 0.45 | ankyrin 1, erythrocytic [Source:HGNC Symbol;Acc:492] |

| | | |
|----------|------|---|
| FAM162A | 0.45 | family with sequence similarity 162, member A [Source:HGNC Symbol;Acc:17865] |
| USP11 | 0.44 | ubiquitin specific peptidase 11 [Source:HGNC Symbol;Acc:12609] |
| MAP4K4 | 0.44 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:6866] |
| C16orf45 | 0.44 | chromosome 16 open reading frame 45 [Source:HGNC Symbol;Acc:19213] |
| UBA1 | 0.44 | ubiquitin-like modifier activating enzyme 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:12469] |
| MRPL35 | 0.44 | mitochondrial ribosomal protein L35 [Source:HGNC Symbol;Acc:14489] |
| B3GNT4 | 0.43 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:15683] |
| SHARPIN | 0.43 | SHANK-associated RH domain interactor [Source:HGNC Symbol;Acc:25321] |
| COPA | 0.43 | coatomer protein complex, subunit alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:2230] |
| MBD3 | 0.43 | methyl-CpG binding domain protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:6918] |
| SF3A1 | 0.43 | splicing factor 3a, subunit 1, 120kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:10765] |
| OGDH | 0.43 | oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide) [Source:HGNC Symbol;Acc:8124] |
| SMYD5 | 0.42 | SMYD family member 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:16258] |
| NCBP1 | 0.42 | nuclear cap binding protein subunit 1, 80kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:7658] |
| NFS1 | 0.42 | NFS1 cysteine desulfurase [Source:HGNC Symbol;Acc:15910] |
| CEBPD | 0.42 | CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta [Source:HGNC Symbol;Acc:1835] |
| TBRG4 | 0.42 | transforming growth factor beta regulator 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:17443] |
| SLC6A8 | 0.42 | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:11055] |
| EPG5 | 0.42 | ectopic P-granules autophagy protein 5 homolog (C. elegans) [Source:HGNC Symbol;Acc:29331] |
| ASPM | 0.41 | asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:19048] |
| TARS | 0.41 | threonyl-tRNA synthetase [Source:HGNC Symbol;Acc:11572] |
| CNTF | 0.41 | ciliary neurotrophic factor [Source:HGNC Symbol;Acc:2169] |
| DEPDC7 | 0.41 | DEP domain containing 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:29899] |
| LSS | 0.41 | lanosterol synthase (2,3-oxidosqualene-lanosterol cyclase) [Source:HGNC Symbol;Acc:6708] |
| TRIM45 | 0.41 | tripartite motif containing 45 [Source:HGNC Symbol;Acc:19018] |
| MYCBP | 0.41 | MYC binding protein [Source:HGNC Symbol;Acc:7554] |
| CD9 | 0.4 | CD9 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:1709] |
| HBP1 | 0.4 | HMG-box transcription factor 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:23200] |
| CLEC4D | 0.4 | C-type lectin domain family 4, member D [Source:HGNC Symbol;Acc:14554] |

| | | |
|---------|------|---|
| PROX1 | 0.4 | prospero homeobox 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:9459] |
| PLIN5 | 0.4 | perilipin 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:33196] |
| EM12 | 0.4 | echinoderm microtubule associated protein like 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:18035] |
| USP42 | 0.4 | ubiquitin specific peptidase 42 [Source:HGNC Symbol;Acc:20068] |
| CASZ1 | 0.4 | castor zinc finger 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:26002] |
| PRDM5 | 0.4 | PR domain containing 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:9349] |
| ZNF283 | 0.4 | zinc finger protein 283 [Source:HGNC Symbol;Acc:13077] |
| SOX9 | 0.4 | SRY (sex determining region Y)-box 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:11204] |
| SENP5 | 0.39 | SUMO1/sentrin specific peptidase 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:28407] |
| TUBA8 | 0.39 | tubulin, alpha 8 [Source:HGNC Symbol;Acc:12410] |
| MOB3C | 0.39 | MOB kinase activator 3C [Source:HGNC Symbol;Acc:29800] |
| TSPAN32 | 0.39 | tetraspanin 32 [Source:HGNC Symbol;Acc:13410] |
| NUDT2 | 0.39 | nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:8049] |
| THUMPD2 | 0.39 | THUMP domain containing 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:14890] |
| ANGPT1 | 0.39 | angiopoietin 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:484] |
| IER2 | 0.38 | immediate early response 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:28871] |
| ABCF3 | 0.38 | ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:72] |
| TJP3 | 0.38 | tight junction protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:11829] |
| HSPB9 | 0.38 | heat shock protein, alpha-crystallin-related, B9 [Source:HGNC Symbol;Acc:30589] |
| CH25H | 0.38 | cholesterol 25-hydroxylase [Source:HGNC Symbol;Acc:1907] |
| PLCZ1 | 0.38 | phospholipase C, zeta 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:19218] |
| CCDC57 | 0.38 | coiled-coil domain containing 57 [Source:HGNC Symbol;Acc:27564] |
| PHF20L1 | 0.38 | PHD finger protein 20-like 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:24280] |
| GMDS | 0.38 | GDP-mannose 4,6-dehydratase [Source:HGNC Symbol;Acc:4369] |
| RAB5B | 0.38 | RAB5B, member RAS oncogene family [Source:HGNC Symbol;Acc:9784] |
| XPO4 | 0.37 | exportin 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:17796] |
| FBXO40 | 0.37 | F-box protein 40 [Source:HGNC Symbol;Acc:29816] |
| TTC7A | 0.37 | tetratricopeptide repeat domain 7A [Source:HGNC Symbol;Acc:19750] |
| WNTT16 | 0.37 | wingless-type MMTV integration site family, member 16 [Source:HGNC Symbol;Acc:16267] |

| | | |
|----------|------|---|
| PNLDC1 | 0.37 | poly(A)-specific ribonuclease (PARN)-like domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:21185] |
| NR4A2 | 0.37 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:7981] |
| CD226 | 0.37 | CD226 molecule [Source:HGNC Symbol;Acc:16961] |
| TSPAN7 | 0.37 | tetraspanin 7 [Source:HGNC Symbol;Acc:11854] |
| PRAMEF11 | 0.37 | PRAME family member 11 [Source:HGNC Symbol;Acc:14086] |
| WRNIP1 | 0.37 | Werner helicase interacting protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:20876] |
| SCAMP4 | 0.37 | secretory carrier membrane protein 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:30385] |
| GLRX2 | 0.36 | glutaredoxin 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:16065] |
| LIN7A | 0.36 | lin-7 homolog A (C. elegans) [Source:HGNC Symbol;Acc:17787] |
| TRIM13 | 0.36 | tripartite motif containing 13 [Source:HGNC Symbol;Acc:9976] |
| CHCHD3 | 0.36 | coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:21906] |
| NEURL2 | 0.36 | neurialized homolog 2 (Drosophila) [Source:HGNC Symbol;Acc:16156] |
| SHC3 | 0.36 | SHC (Src homolog 2 domain containing) transforming protein 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:18181] |
| PCGF2 | 0.36 | polycomb group ring finger 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:12929] |
| SLC12A1 | 0.36 | solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporter), member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:10910] |
| TBC1D32 | 0.36 | TBC1 domain family, member 32 [Source:HGNC Symbol;Acc:21485] |
| KATNAL2 | 0.36 | katanin p60 subunit A-like 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:25387] |
| UBE2T | 0.36 | ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative) [Source:HGNC Symbol;Acc:25009] |
| FXR2 | 0.36 | fragile X mental retardation, autosomal homolog 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:4024] |

ANNEXES ARTICLES EN LIEN AVEC LE TRAVAIL
DE THESE:

LE TISSU ADIPEUX : COULEUR, LOCALISATION, FONCTIONS ET AUTRES DONNÉES NOUVELLES

par **Maud ALLIGIER¹, Kévin SEYSSEL^{2,3,4}, Emmanuel DISSE^{2,3,4}, Martine LAVILLE^{2,3,4}**
(Lyon, France et Louvain, Belgique)

- Bien que le tissu adipeux ait été longtemps considéré comme un simple tissu de stockage des lipides, il est maintenant reconnu comme un organe hétérogène et complexe tant au niveau cellulaire, tissulaire qu'au niveau de l'organisme. De sa localisation, sa couleur et son environnement dépendent ses diverses fonctions. Le tissu adipeux brun produit de la chaleur et participe à la balance énergétique. Il existe actuellement un regain d'intérêt scientifique à l'égard de ce tissu compte tenu de ses éventuelles implications thérapeutiques.
- Le tissu adipeux blanc, majoritaire, est le principal lieu de stockage énergétique de l'organisme. Il assure des fonctions de synthèse et d'hydrolyse des triglycérides ainsi qu'une fonction sécrétoire d'adipokines. Sa localisation sous-cutanée ou viscérale lui confère des propriétés différentes. Le tissu adipeux et sa capacité d'expansion jouent un rôle prépondérant dans les complications de l'obésité. De multiples dysfonctionnements tissulaires pourraient être impliqués dont l'inflammation, l'hypoxie, et les anomalies de l'angiogenèse et du remodelage de la matrice extracellulaire. Cette revue rapporte l'ensemble des aspects physiologiques et physiopathologiques actuels du tissu adipeux dont les connaissances sont en constante évolution.

Mots-clé : Tissu adipeux blanc, tissu adipeux brun, tissu adipeux beige, obésité, adipocyte, lipolyse, lipogenèse, inflammation, expansion du tissu adipeux, remodelage du tissu adipeux.

INTRODUCTION

Le domaine d'étude du tissu adipeux est depuis ces 20 dernières années en plein essor mais également en constante évolution. Ce tissu, qui a longtemps été considéré comme simple organe de stockage des lipides, est en fait au cœur de la mise en place des anomalies métaboliques liées à l'obésité. En effet, en plus de son rôle essentiel dans le stockage et la mobilisation des lipides, le tissu adipeux est un véritable organe endocrine capable de synthétiser et de sécréter plusieurs dizaines de messagers moléculaires (hormones, cytokines, etc...) démontrant la richesse de ses interactions avec l'ensemble de l'organisme. Le tissu adipeux est un organe complexe et hétérogène tant à l'échelle du corps entier, qu'à l'échelle tissulaire et même cellulaire.

A l'échelle du corps entier, il existe deux types de tissu adipeux bien différents : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Partant du postulat initial que, chez l'homme, le tissu adipeux brun était quantitativement et fonctionnellement anecdotique, la plupart des études humaines se sont concentrées jusqu'à il y a peu sur la physiologie du tissu

adipeux blanc. L'émergence de l'importance du tissu adipeux brun chez l'homme, objectivée en partie grâce à l'imagerie fonctionnelle, est donc récente.

A l'échelle tissulaire, le tissu adipeux blanc est également hétérogène puisqu'il existe différents types de dépôts de ce tissu aux caractéristiques de stockage et de sécrétion bien distinctes. On différencie classiquement les dépôts de tissu adipeux sous-cutanés, et les dépôts viscéraux. La contribution respective de ces différents dépôts à la mise en place des anomalies métaboliques associées à l'obésité n'est pas équivalente. On considère généralement le tissu adipeux sous-cutané comme le réservoir sain des lipides de l'organisme contrairement au tissu adipeux viscéral, dont l'accumulation est délétère et fortement associée aux anomalies métaboliques et cardiovasculaires.

Enfin au niveau cellulaire, le tissu adipeux blanc est encore une fois hétérogène. En plus des adipocytes, cellules ultra-spécialisées dans le stockage des lipides, ce tissu comporte une multitude d'autres types cellulaires regroupés sous le terme de fraction du stroma vasculaire. Cette fraction comprend des fibroblastes, des pré-adipocytes, des cellules immunitaires, des cellules endothéliales et des cellules progénitrices. Ces différentes cellules, qui n'ont pas pour rôle de stocker les lipides, participent néanmoins au développement du tissu adipeux et également à son activité endocrine.

Notons qu'en plus de cette hétérogénéité qui fait toute la richesse fonctionnelle de cet organe, le tissu adipeux n'est pas un tissu inerte mais au contraire particulièrement plastique avec de grandes capacités de remodelage. En effet, le tissu adipeux a la capacité de s'adapter, de se remodeler, de changer sa composition et ses caractéristiques cellulaires. Ces adaptations, ou leur absence, pourraient être à l'origine des anomalies métaboliques observées lors d'une prise de poids et l'enjeu actuel reste leur identification précise, afin d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Bien que le tissu adipeux n'ait pas encore dévoilé toutes ses facettes, nous proposons, dans cette revue, de synthétiser l'ensemble des connaissances actuelles sur le sujet en lien avec sa couleur, sa localisation et ses fonctions, ainsi que les connaissances les plus récentes sur son développement et ses adaptations au cours de la prise de poids.

LE TISSU ADIPEUX BRUN

Le tissu adipeux brun peut être défini comme un tissu spécialisé dans la dissipation d'énergie sous forme de chaleur [1]. Les premières études qui se sont intéressées à ce tissu ont mis en évidence son rôle crucial dans la thermogenèse sans frisson chez les petits animaux hibernants. Dans les années 1980, beaucoup d'études se sont intéressées à la contribution de ce tissu dans le processus de thermogenèse induite par l'alimentation, faisant de lui un nouvel acteur métabolique impliqué dans le contrôle de la balance énergétique. Malheureusement faute d'avoir pu identifier des dépôts fonctionnels chez l'homme adulte, le tissu adipeux brun a été quelque peu délaissé. Il a fallu attendre le développement de nouvelles techniques d'imagerie fonctionnelle, permettant au cours des années 2000 à plusieurs équipes suédoises de mettre en évidence des dépôts fonctionnels de tissu adipeux brun le long de la colonne vertébrale chez l'homme adulte [1-6], ouvrant ainsi la voie à de nouvelles recherches sur ce tissu.

a) *Caractéristiques du tissu adipeux brun*

La localisation : De par leur aspect adipeux et leur couleur brune caractéristique, les dépôts de tissu adipeux brun sont aisément identifiables chez le petit animal. Ces derniers sont localisés dans les régions inter-scapulaires, péri-aortiques, péri-cardiaques, péri-rénales ainsi qu'entre les muscles du cou et dans les creux axillaires.

Chez l'homme, il a longtemps été considéré que le tissu adipeux brun disparaissait après la période foetale. Toutefois, les récentes études d'imagerie fonctionnelle ont identifié la présence persistante de ce tissu au niveau cervical [1,7]. Du tissu adipeux brun a également été identifié en région péri-rénale sur des biopsies tissulaires, ce qui a été confirmé au niveau moléculaire par une quantification de la protéine UCP1, caractéristique de ce dépôt.

Que ce soit chez l'homme ou l'animal les dépôts de tissu adipeux brun sont localisés à proximité des gros vaisseaux, permettant une diffusion optimale de la chaleur produite par ce tissu.

Les adipocytes bruns : Les adipocytes bruns sont très différents des blancs bien qu'ils partagent un rôle similaire dans le stockage des lipides. Des caractéristiques à la fois morphologiques, biochimiques et fonctionnelles permettent de différencier les adipocytes blancs des bruns [8].

Les adipocytes bruns sont des cellules multiloculaires qui présentent plusieurs gouttelettes lipidiques, sites de stockage des triglycérides. Ils présentent également un contenu important en mitochondries leur permettant d'assurer leur fonction oxydative et leur donnant cette couleur brune caractéristique (cytochromes). Le cytoplasme de ces cellules contient de nombreux grains de glycogène. Au niveau fonctionnel, les adipocytes bruns sont les seuls à pouvoir convertir l'énergie libérée par l'oxydation des acides gras en chaleur via le mécanisme découplage mitochondrial, assuré par la protéine UCP1 (Uncoupling protein 1), marqueur spécifique du tissu adipeux brun. Ces adipocytes bruns sont à la fois richement vascularisés et innervés, principalement par le système nerveux sympathique qui agit via la libération de noradrénaline.

Enfin, les régulateurs transcriptionnels des adipocytes bruns sont différents de ceux des adipocytes blancs. En effet, les processus de différenciation et d'oxydation sont sous le contrôle de PGC1 α (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 α), FoxC2 (Forkhead box C2) et PRDM16 (PRD1-BF-1-RIZ1 ; homologous domain containing protein-16) [9,10].

Le découplage mitochondrial : L'oxydation des substrats au niveau de la chaîne respiratoire a pour but ultime la production d'ATP qui est la forme d'énergie utilisable par nos cellules. Dans les mitochondries, les complexes de la chaîne mitochondriale permettent d'établir un gradient de protons entre les membranes interne et externe de la mitochondrie (*figure 1*). Ce gradient de protons permet de générer de l'ATP et de l'eau à partir d'ADP, via l'ATP-ase. Généralement, l'organisme tente d'optimiser le rendement de ces réactions. Néanmoins, dans certaines conditions, une partie de l'énergie est produite sous forme de chaleur, ce qui d'un point de vue énergétique pourrait être considéré comme une perte énergétique pour l'organisme, excepté lors d'une exposition au froid.

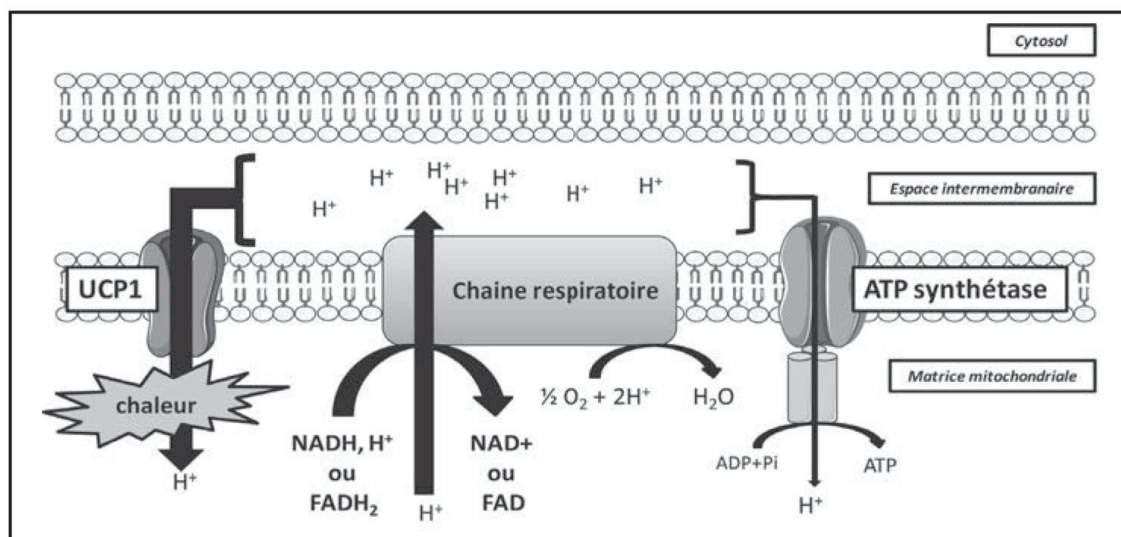


Figure 1 : **Schéma simplifié représentant le découplage mitochondrial par UCP1 au sein d'un adipocyte brun (K. Seyssel).** Le gradient électrochimique de protons généré par la chaîne respiratoire va permettre la production de chaleur via UCP1 au détriment de la synthèse d'ATP. UCP1 : Uncoupling protein 1 ; NADH : nicotinamide adénine dinucléotide ; FADH₂ : flavine adénine dinucléotide ; ADP : adénine diphosphate ; ATP : adénine triphosphate ; Pi : phosphate inorganique.

Le tissu adipeux brun est spécialisé dans cette production de chaleur. Il possède les caractéristiques anatomiques, la localisation et l'équipement protéique nécessaires et adéquats pour assurer cette fonction. En effet, dans les mitochondries d'adipocytes bruns, une partie du gradient de protons est détournée de l'ATP-ase au profit d'UCP1. En traversant UCP1, le gradient de protons ne produit pas d'ATP mais uniquement de la chaleur. Dans ces conditions la mitochondrie est dite découplée.

b) Conversion du tissu adipeux blanc en tissu adipeux brun

Anatomiquement parlant, les dépôts de tissu adipeux blanc et brun ne sont pas aussi clairement dissociés qu'il y paraît. En effet, plusieurs études ont rapporté la présence d'adipocytes bruns au sein même de certains dépôts de tissu adipeux blanc [8,11]. Cette présence d'adipocytes bruns a été confirmée en quantifiant la protéine UCP1 mais également en quantifiant l'expression d'un acteur crucial dans la différenciation des adipocytes bruns : PRDM16. La présence d'adipocytes bruns au sein du tissu adipeux blanc a été démontrée dans plusieurs espèces (chien, rongeurs et même chez l'homme) et serait sous le contrôle de différents facteurs tels que l'exposition chronique au froid, les agonistes β 3-adrénergiques ou encore les agonistes PPAR γ (thiazolidinediones) [1-4]. Néanmoins, les mécanismes exacts de cette conversion ou de cet enrichissement en adipocytes bruns du tissu adipeux blanc restent encore à identifier. En effet, bien que ces adipocytes bruns au sein du tissu adipeux blanc présentent des caractéristiques morphologiques identiques à celles des adipocytes bruns classiques (multilocularité, couleur brune...) leurs origines pourraient être différentes comme l'a mis en évidence l'équipe du Pr. JP Giacobino. Ces travaux, tendent à démontrer l'existence d'une nouvelle classe d'adipocyte : les adipocytes beiges ou « brite cells ». Une autre hypothèse défendue par l'équipe de Cinti, est qu'il existerait une plasticité totale de certains adipocytes leur permettant de se transdifférencier en adipocytes blancs ou bruns selon les besoins et les facteurs en présence [12].

c) *Le tissu adipeux brun comme nouvel acteur dans la lutte contre l'obésité chez l'homme*

Il a été calculé chez le rongeur que la valeur énergétique du tissu adipeux brun était de l'ordre de 300 à 500 watts par kilogramme de tissu, faisant donc du tissu adipeux brun ou beige un acteur à prendre en compte dans la balance énergétique des sujets humains, pour autant que cette valeur énergétique soit équivalente entre les deux espèces. Trop peu d'études ont été menées à ce jour pour déterminer si des anomalies du tissu adipeux brun ou beige pouvaient être en cause dans la prise de poids. Seules certaines études ont montré la diminution de tissu adipeux brun chez des individus obèses, sans pour autant l'associer à des anomalies métaboliques [1,3,6]. Par ailleurs, plusieurs études de stimulation du développement d'adipocytes beiges, dans le but de contrer la prise de poids, ont donné des résultats très prometteurs mais uniquement chez l'animal. Le champ d'investigation du tissu adipeux brun comme acteur énergétique dans les variations de poids reste donc encore ouvert et susceptible de s'enrichir dans les prochaines années.

LE TISSU ADIPEUX BLANC

Le tissu adipeux blanc représente 15 à 20 % du poids corporel chez l'homme mince et 20 à 25 % chez la femme de poids normal. Il est organisé en lobules d'une taille moyenne de 5 mm, au cœur duquel se trouvent les adipocytes. Les lobules sont entourés par du tissu conjonctif relativement dense qui supportent les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et les terminaisons nerveuses.

Ce tissu représente la plus grande réserve énergétique de l'organisme. Il est capable de stocker les lipides (phase de ré-estérification) en période post-prandiale et de les restituer selon les besoins durant les périodes interprandiales (phase de lipolyse). Il s'agit donc d'un organe essentiel dans le maintien de l'homéostasie énergétique qui est soumis à une très fine régulation à la fois hormonale et nutritionnelle. Comme précédemment évoqué, le tissu adipeux blanc est également un organe endocrine à l'activité sécrétoire intense.

a) *Les différents dépôts*

Il existe différents dépôts de tissu adipeux blanc dans l'organisme qui ne sont pas équivalents en termes de taille et de fonction : le *tissu adipeux sous-cutané*, le *tissu adipeux viscéral*, le *tissu adipeux de soutien* et le *tissu adipeux de la moelle osseuse*. Seuls les dépôts sous-cutanés et viscéraux participent notablement au métabolisme énergétique.

Le *tissu adipeux sous-cutané* ou hypoderme est présent entre l'épiderme et l'aponévrose musculaire au niveau de l'organisme entier. Il contribue à la majeure partie du stockage des lipides du corps, puisqu'il contient environ 80 % de la graisse de l'organisme. Il participe aux fonctions d'isolation thermique et d'amortissement des chocs. Cette couche de graisse n'est pas répartie uniformément à l'âge adulte et elle modèle la silhouette selon le sexe.

Le *tissu adipeux viscéral* est situé uniquement au niveau thoraco-abdominal et plus profondément que le tissu adipeux sous-cutané. Il entoure les viscères contenus dans la cavité abdominale. Il constitue également un réservoir des lipides de l'organisme. Il représente 10-20 % de la graisse totale chez l'homme sain et 5-8 % chez les femmes [13]. Il existe différents dépôts de tissu adipeux viscéral chez l'Homme [14] : épiploïque, mésentérique, rétro-péritonéal (péri-rénal), gonadique et péricardique.

b) Répartition du tissu adipeux blanc et ses conséquences métaboliques

L'accumulation de lipides dans les différents dépôts de tissu adipeux n'a pas les mêmes répercussions sur l'organisme. Les études pionnières de Jean Vague ont mis en évidence le rôle délétère de l'accumulation de la graisse dans les dépôts adipeux de la partie haute du corps [15].

En effet, on distingue l'accumulation excessive de graisse dans la partie haute du corps (principalement les dépôts de tissu adipeux sous-cutané et viscéral au niveau abdominal: *obésité centrale ou abdominale ou androïde*), de celle dans la partie basse du corps (dépôts de graisse sous-cutanée au niveau des cuisses et de la région glutéale: *obésité périphérique, glutéo-fémorale ou gynoïde*).

Lorsque l'on considère le tissu adipeux de la partie supérieure du corps, c'est préférentiellement l'accumulation de lipides dans le tissu adipeux viscéral qui serait délétère pour la santé, associée aux complications métaboliques et cardiovasculaires [16]. En effet, à adiposité égale, les individus ayant plus de tissu adipeux viscéral montrent des complications métaboliques plus sévères que les individus à obésité dite « sous-cutanée » [17-19].

Le tissu adipeux du bas du corps, constitué exclusivement de tissu adipeux sous-cutané, est décrit comme le réservoir sain des lipides de l'organisme ayant même des effets protecteurs liés entre autres à sa faible activité lipolytique [20,21].

Chaque dépôt de tissu adipeux (sous-cutané profond ou superficiel, viscéral, haut ou bas du corps) possède des caractéristiques lipolytiques [22], sécrétoires et de synthèse des triglycérides [23] qui lui sont propres. La taille et le nombre des cellules ainsi que l'expression de leurs gènes semblent varier en fonction du type de dépôt mais aussi en fonction de facteurs physiologiques (âge, sexe, corpulence, activité physique, alimentation) ou pathologiques (diabète, obésité) [13]. Ceci rend donc difficile voir impossible l'extrapolation des données d'un dépôt à l'organisme entier.

c) Composition du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc se compose d'adipocytes mais également d'autres types cellulaires regroupés sous le terme de cellules de la fraction du stroma vasculaire (SVF).

Les adipocytes : De nombreuses cellules de l'organisme ont la capacité de stocker des lipides au sein de leur cytoplasme, mais aucune ne remplit toutes les fonctions adipocytaires. L'adipocyte présente toute la machinerie enzymatique et protéique permettant d'assurer sa fonction de stockage. Cellule sphérique pouvant atteindre 100 à 200µm, l'adipocyte contient au niveau de son cytoplasme une volumineuse vacuole lipidique en position centrale, et son noyau est repoussé contre la membrane plasmique. Les adipocytes assurent le rôle de synthèse et d'hydrolyse des triglycérides, et ils présentent également une fonction sécrétoire avec la libération de plusieurs adipokines.

La gouttelette lipidique : La vacuole lipidique également appelée gouttelette lipidique, qui contient principalement des triglycérides, a une taille qui peut aller de 30 à 150 µm selon sa teneur en lipides. On peut considérer cette gouttelette comme un organite à part entière au sein de l'adipocyte [24]. Sa structure est très importante puisqu'elle permet d'isoler les lipides stockés des autres éléments du cytoplasme de la cellule, protégeant ainsi

la cellule des phénomènes de lipotoxicité. La couche externe de cette gouttelette est composée de phospholipides et de cholestérol dans laquelle sont aussi enchâssées de multiples protéines. Ces dernières ont un rôle de structure mais elles régulent également les mécanismes de stockage et de mobilisation des lipides [25]. Le rôle de toutes ces protéines n'a pas encore été complètement identifié. Les protéines spécifiques de la gouttelette lipidique les plus connues sont la périlipine et la cavéoline-1. Des mutations de ces protéines sont associées à des défauts lipolytiques et à des lipoatrophies plus ou moins sévères [26,27].

Les protéines CIDE (Cell death-inducing DNA fragmentation factor-45-like effector) sont également présentes au niveau de la gouttelette.

La fraction du stroma vasculaire : En plus des adipocytes, le tissu adipeux contient d'autres types cellulaires regroupés sous le terme de cellules du stroma vasculaire (SVF). Ces différents types cellulaires présents dans le tissu adipeux n'ont pas pour rôle de stocker les lipides, contrairement aux adipocytes. Il s'agit de fibroblastes, de pré-adipocytes, de cellules immunitaires, de cellules endothéliales et de cellules progénitrices [28-30].

Grâce à la cytométrie en flux associée à l'utilisation de fluorochromes appropriés, il est maintenant possible de séparer les différentes populations cellulaires de la fraction du stroma vasculaire selon leurs marqueurs membranaires. Actuellement, de nombreuses études s'intéressent à caractériser précisément ces types cellulaires et leurs fonctions. La caractérisation des cellules immunitaires du tissu adipeux est d'intérêt puisque ces populations évoluent au cours de la prise de poids et pourraient être impliquées dans le maintien du syndrome inflammatoire systémique à bas bruit associé à l'obésité.

Les cellules du stroma vasculaire sont largement impliquées dans l'activité sécrétoire du tissu adipeux (80% des sécrétions du tissu adipeux trouveraient leur origine dans ces cellules), et ces sécrétions pourraient se modifier au cours de la prise de poids. Compte tenu des effets pléiotropes des molécules sécrétées par le tissu adipeux, l'identification exacte des cellules qui les synthétisent parmi l'ensemble des différents types cellulaires composant le tissu adipeux, ainsi que la caractérisation des mécanismes pouvant réguler leur synthèse, sont indispensables.

d) La différenciation adipocytaire

L'adipogenèse ou différenciation adipocytaire est le processus permettant le passage du pré-adipocyte présent dans la fraction du stroma vasculaire en adipocyte mature, ce dernier n'ayant aucune capacité de division ni de prolifération. Ce processus prend place lors du développement du tissu adipeux chez le nouveau né, mais il est également possible, sous certaines conditions, d'observer chez l'adulte la formation de nouveaux adipocytes dans le cadre soit du renouvellement des adipocytes soit d'une prise de poids massive.

La différenciation adipocytaire est un processus séquentiel, durant lequel une série de modifications morphologiques, moléculaires et biochimiques prennent place [31].

La différenciation adipocytaire comprend des événements précoces et tardifs. Les événements précoces concernent le remodelage du cytosquelette et de la matrice extracellulaire. On assiste initialement à un changement de composition de la matrice extracellulaire qui évolue vers une structure de type « lame basale » (collagène IV, entactine et

laminine) [32]. Une phase d'expansion clonale, étape de réplication cellulaire, succède à ces remaniements matriciels. Ces événements précoces sont suivis de la différenciation terminale au cours de laquelle les adipocytes subissent des changements morphologiques majeurs, acquièrent leurs propriétés de synthèse des triglycérides, de lipolyse ainsi que leur activité sécrétoire et commencent à accumuler des lipides.

La régulation de l'adipogenèse est sous le contrôle de nombreux facteurs de transcription : C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins), des PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptor) et des protéines à motif HLH (SREBP-1c : sterol regulatory element binding protein-1c, ADD1 chez le rongeur: Adipocyte determination and differentiation factor 1) [33] qui sont activés de manière séquentielle et se régulent les uns les autres. Notons que l'expression de ces facteurs de transcription impliqués dans l'adipogenèse est également sous l'influence de facteurs environnants tels que l'insuline, les acides gras, le TNF α , la voie de signalisation Wnt... [34].

e) Renouvellement des adipocytes

Il a été longtemps admis que les adipocytes étaient des cellules qui ne se renouvelaient pas. En fait, les adipocytes présentent un renouvellement très lent. Les études de l'équipe de Peter Arner ont été les premières à mettre en évidence ce renouvellement et à le quantifier. Afin de mesurer un renouvellement aussi lent, cette équipe a utilisé une datation au carbone 14 et a pu mettre en évidence qu'en moyenne 10% des adipocytes du tissu adipeux humain sous-cutané étaient remplacés tous les ans [35,36].

f) Fonction de stockage

Le transport des acides gras : Le passage des acides gras, libérés par la lipolyse ou liés à l'albumine, à travers la membrane est encore discuté. Des phénomènes de diffusion passive, de « flip-flop », mais également des transporteurs spécifiques coexistent au niveau de la membrane plasmique des adipocytes. Différentes protéines peuvent intervenir dans ce transport : FAT (fatty acid translocase) / CD36, les FATPs (fatty acid transport proteins) et FABPpm (fatty acid binding proteins).

Une fois dans la cellule, un autre transporteur prend en charge les acides gras. Il s'agit des FABPs (fatty acid binding protein). La protéine FABP4, produit du gène aP2, spécifique du tissu adipeux, faciliterait le transport des acides gras dans la cellule mais également orienterait les acides gras vers différentes régions cellulaires [37].

Afin d'être utilisés, les acides gras sont activés en acyl-CoA sous l'action de l'acyl-CoA synthétase et pris en charge par une ACBP (Acyl-CoA binding protein) pour leur trafic intracellulaire.

En période postprandiale, les acides gras vont principalement être stockés au niveau de la gouttelette lipidique. Cependant, un certain pourcentage d'entre eux pourra être oxydé au niveau de la mitochondrie via la voie de la β -oxydation. Contrairement au muscle squelettique, le tissu adipeux ne contribue pas de manière significative à l'oxydation des acides gras libres. L'orientation des acides gras vers l'une ou l'autre de ces voies serait en partie dépendante de l'action de certaines isoformes d'Adiposee acyl-CoA synthetase-1 (ACSL) [38].

Synthèse des triglycérides : Il existe deux voies de synthèse des triglycérides au sein de l'adipocyte, la ré-estérification des acides gras issus de la lipolyse intravasculaire et la lipogénèse de novo dont le précurseur est le citrate (*figure 2*).

Au cours de la ré-estérification, trois acides gras activés sont condensés sur un glycérol 3P par estérification successive et action des enzymes GPAT (glycérol phosphate acyl transférase), AGPAT (acylglycérolphosphate acyl transférase) et DGAT (diacylglycérol acyl transférase) [39]. Le produit final est un triglycéride [40]. Avant l'étape d'estérification, les acyl-CoA présents peuvent subir des étapes d'élongation et de désaturation au niveau du réticulum endoplasmique, permettant de réduire leur rigidité et ainsi améliorer leur stockage. Ces étapes sont assurées par des enzymes spécifiques telles que des désaturases (SCD1 (stéaroyl-coa désaturase 1) et des élongases (ELOVL (elongation of very long chain) [41].

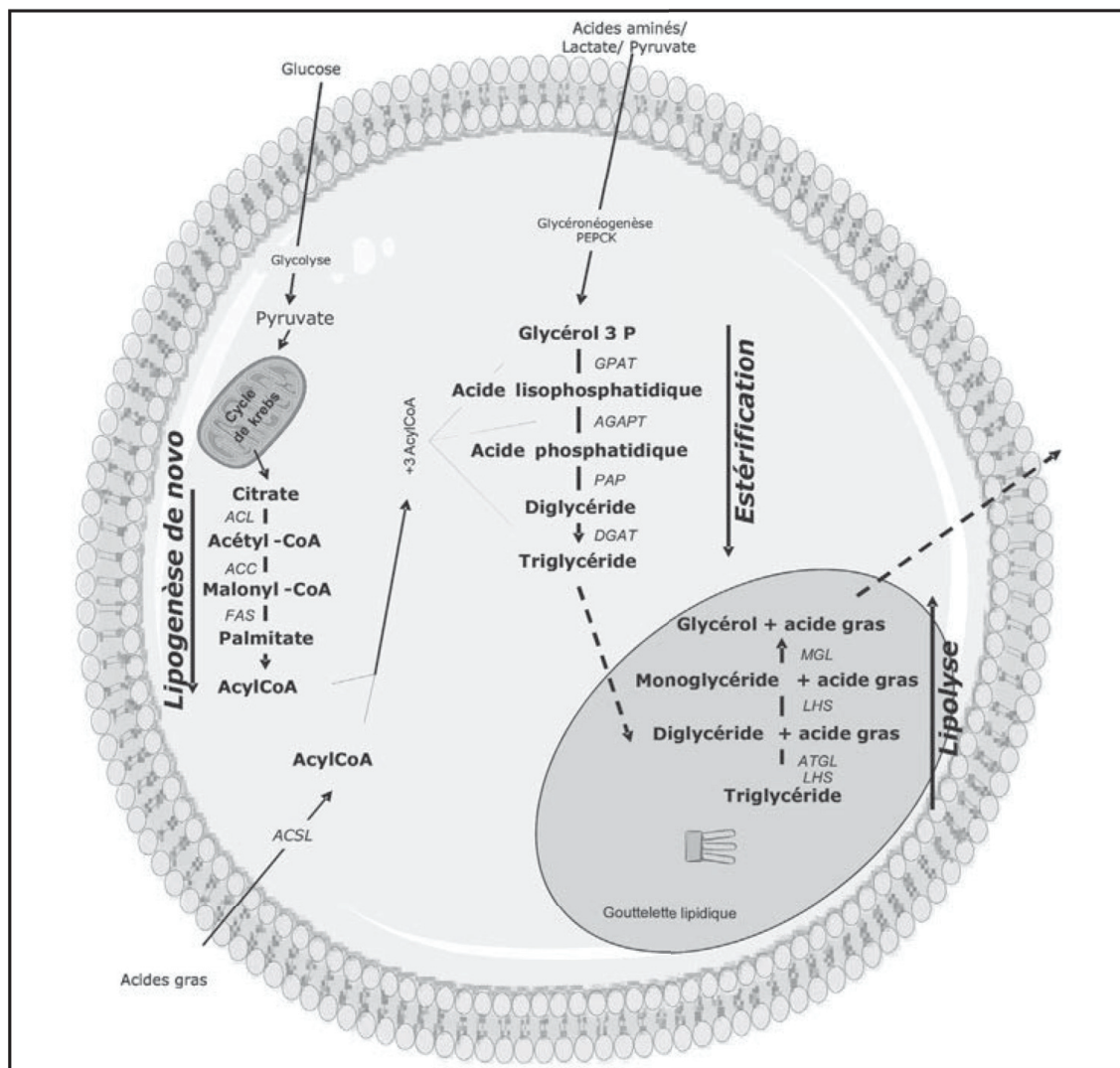


Figure 2 : Voies de synthèse et de dégradation des triglycérides au sein de l'adipocyte (M. Alligier, Thèse de Sciences, 2013).

ACC : Acetyl-CoA carboxylase, ACL : ATP citrate lyase, ACSL : AcylCoA synthétase long chain, AGAPT : acylglycérolphosphate acyl transférase, ATGL : Adipose Triglyceride lipase, DGAT : Diacylglycérol acyl transférase, FAS : Fatty acide synthase, LHS : Lipase hormono-sensible, MGL : Monoglyceride lipase, PAP : acide phosphatidique phosphatase, PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase

La lipogenèse *de novo* est une autre voie de synthèse des triglycérides (figure 2). Cette voie est activée lorsque les processus oxydatifs fournissent plus d'énergie que nécessaire. Le terme de lipogenèse *de novo* désigne la néosynthèse d'acides gras à partir de précurseurs non lipidiques, principalement le glucose. Dans l'espèce humaine, la lipogenèse est majoritairement hépatique, alors que chez le rongeur elle s'effectue également dans le tissu adipeux blanc. Bien que la lipogenèse adipocytaire soit très peu active chez l'homme, le tissu adipeux possède les principales enzymes nécessaires à cette voie, FAS (Fatty acid synthase) et ACC α (Acetyl-CoA carboxylase), ainsi que les facteurs de transcription impliqués. Néanmoins, la lipogenèse même hépatique reste mineure comme source d'apport de triglycérides chez l'homme par rapport à la source alimentaire. Cette lipogenèse *de novo* serait stimulée dans des conditions où les apports énergétiques sont très importants, principalement sous forme de glucide ou de fructose [42,43]. Cette voie métabolique débute avec la transformation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA sous l'action de l'acétyl-CoA carboxylase. La FAS permet ensuite la synthèse d'un acide gras par condensation d'un acétyl-CoA sur un malonyl-CoA [40]. Plusieurs cycles sont nécessaires afin de constituer le squelette carboné de l'acide gras qui comprend entre 6 et 18 carbones. Différentes élongases et désaturases, présentes au niveau du réticulum endoplasmique, vont permettre l'allongement de la chaîne carbonée ainsi que l'introduction de doubles liaisons. Les acides gras nouvellement synthétisés sont ensuite estérifiés en triglycérides selon la voie décrite précédemment.

Régulation de la synthèse des triglycérides et de la lipogenèse : Les voies de synthèse des triglycérides sont soumises à un contrôle nutritionnel mais également pluri-hormonal. Selon les protéines impliquées dans ces voies, la régulation se fait à différents niveaux transcriptionnels ou traductionnels. L'insuline et le glucose induisent les enzymes de la lipogenèse et de la ré-estérification des acides gras, alors que le glucagon et les acides gras polyinsaturés les inhibent. L'action de l'insuline semble être médiée par le facteur de transcription SREBP-1c [44]. La synthèse des triglycérides est également stimulée *via* l'ASP (acylation stimulating protein). Cette protéine, synthétisée par l'adipocyte, est capable de stimuler la DGAT [45].

g) La lipolyse

Mécanisme d'action : A jeun, le tissu adipeux permet la fourniture à l'organisme de l'énergie nécessaire à sa survie grâce au processus complexe et finement régulé qu'est la lipolyse. Elle permet l'hydrolyse des triglycérides contenus dans la gouttelette lipidique des adipocytes en diglycérides, puis monoglycérides afin de former des acides gras et du glycérol (figure 2). Elle dépend de l'action séquentielle de 3 lipases principales : la lipase hormono-sensible (LHS), l'adipocyte triglycéride lipase (ATGL) et la monoglycéride lipase (MGL).

L'hydrolyse des triglycérides et des diglycérides a longtemps été décrite comme un phénomène dépendant exclusivement de l'action de la LHS. Il a été découvert que cette hydrolyse dépendait également de l'action de l'ATGL. Bien qu'étant capable *in vitro* d'hydrolyser les triglycérides, diglycérides et monoglycérides, *in vivo* la LHS agit de concert avec l'ATGL et la MGL pour une lipolyse optimale. Lorsque la lipolyse est stimulée, la LHS est phosphorylée et transportée au niveau de la gouttelette lipidique où elle va pouvoir procéder à l'hydrolyse des réserves lipidiques. L'ATGL est également transportée au niveau de la gouttelette lipidique lors de la stimulation de la lipolyse ; elle doit

être co-localisée avec la LHS pour agir. La dernière étape de la lipolyse requiert l'activité de la MGL. Elle hydrolyse les 2-monoglycérides en acide gras et glycérol. Cette enzyme n'est pas sous le contrôle hormonal de la lipolyse.

Contrôle de la lipolyse : la lipolyse est un phénomène finement régulé puisqu'un défaut d'activité lipolytique du tissu adipeux pourrait conduire à la rétention des lipides dans le tissu et donc à l'obésité. Inversement, une activité lipolytique importante conduirait à la libération par le tissu d'acides gras libres qui, si elle est associée à un défaut d'oxydation des lipides, contribuerait aux stockages ectopiques de ces lipides dans l'organisme.

Ce processus est régulé par de multiples signaux d'origine nerveuse, endocrine ou paracrine, qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques [46]. Ces différentes voies convergent vers la modulation des niveaux d'AMPc ou de GMPc qui influencent l'activité et la localisation de la LHS. Les principaux systèmes de régulation sont les catécholamines et l'insuline (figure 3).

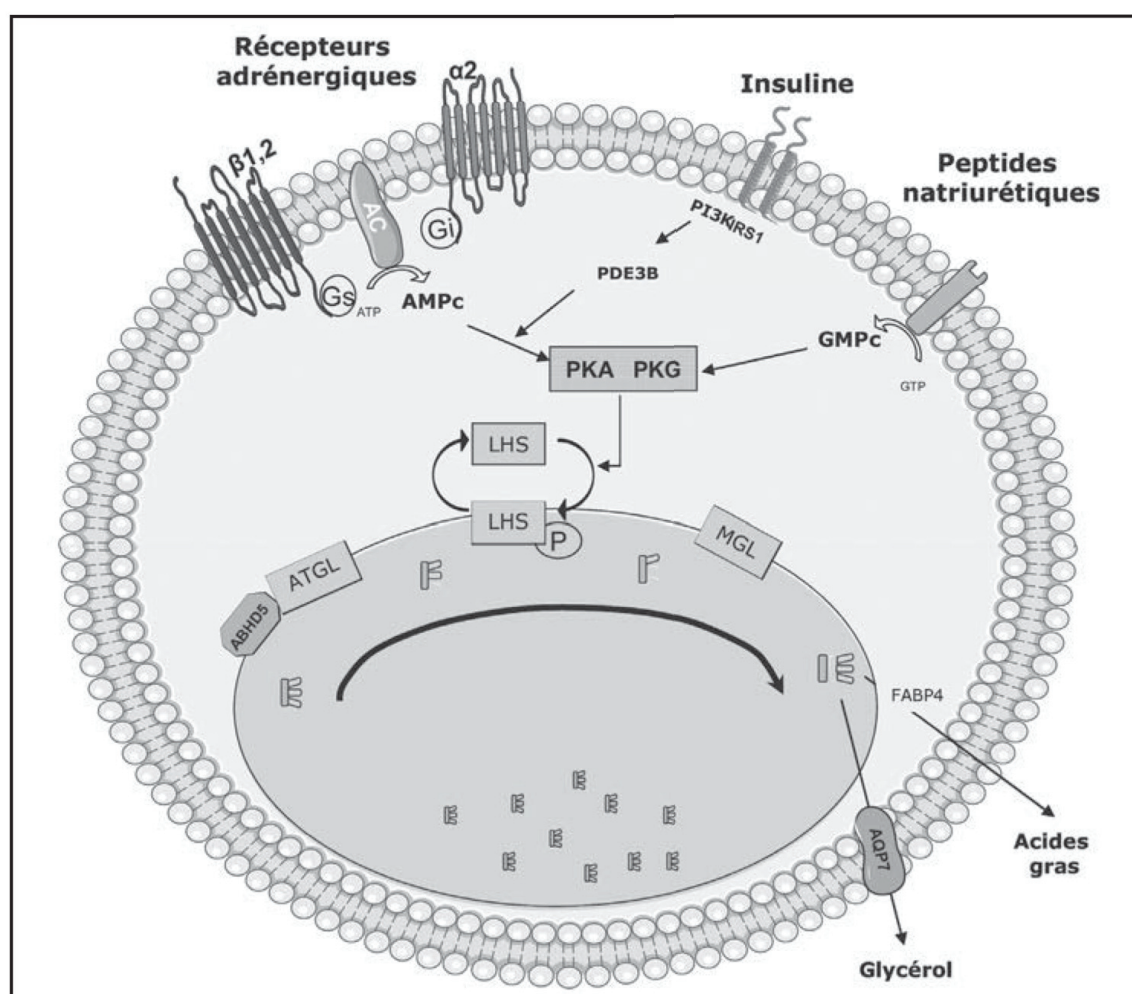


Figure 3 : Principales voies de régulation de la lipolyse au sein de l'adipocyte (M. Alligier, Thèse de Sciences, 2013).

ABHD5 : alpha/beta-hydrolase domain-containing protein 5, **AC** : Adénylate cyclase, **AQP7** : Aquaporine 7, **ATGL** : Adipose triglyceride lipase, **FABP4** : Fatty acid-binding protein 4, **IRS1** : Insulin receptor substrate 1, **LHS** : Lipase hormono-sensible, **MGL** : Monoglycéride lipase, **PDE3B** : phosphodiesterase 3B, **PI3K** : phosphatidylinositol-3 kinase, **PKA/G** : Protéine kinase A/G.

En plus de ces deux grands modulateurs des réserves lipidiques de l'organisme, une nouvelle voie a été récemment découverte par l'équipe du Pr. Max Lafontan, impliquant les peptides natriurétiques [47]. La fixation de ces peptides à leur récepteur induit la formation de GMPc via l'action de la guanylate cyclase. L'augmentation de GMPc cytoplasmiques conduit à l'activation de la PKG (Protéine kinase G), permettant la phosphorylation de la LHS. Cette voie de régulation de la lipolyse est principalement sollicitée lors de l'exercice physique, au cours duquel on assiste à une augmentation de la concentration plasmatique de peptide natriurétique (ANP).

Certaines protéines constitutives de l'adipocyte, ou sécrétées par le tissu, vont agir pour moduler la lipolyse sans être impliquées directement dans l'hydrolyse des triglycérides. C'est le cas de la périlipine dont la phosphorylation par la PKA (protéine kinase A) lui permet des changements de configuration libérant ainsi une surface d'accès plus importante pour l'action de la LHS [48]. De même la cavéoline 1 pourrait directement interagir avec les sous-unités de la PKA et ainsi diminuer la phosphorylation de la périlipine conduisant à une inhibition de la lipolyse [49].

L'ABHD5 (alpha/beta-hydrolase domain-containing protein 5) est capable de moduler la lipolyse en se liant à l'ATGL. Cette protéine est fixée aux périlipines de la gouttelette lipidique lorsque les niveaux AMPc cytoplasmiques sont bas. En revanche, lorsque ces derniers augmentent, la PKA phosphoryle la périlipine et libère ainsi l'ABHD5 qui va se fixer sur l'ATGL et l'active [50]. Enfin, le TNF α (tumor necrosis factor α), mais également d'autres cytokines, l'IL6 (Interleukine 6), l'IL1 β (Interleukine 1 β), synthétisés par le tissu adipeux, peuvent également moduler la lipolyse. Ces cytokines, dont la sécrétion augmente dans l'obésité [51], contribueraient à augmenter la lipolyse en période basale [52,53].

h) Activité sécrétoire et endocrine du tissu adipeux

Le tissu adipeux est doué d'une activité sécrétoire importante, mais près de 30 ans furent nécessaires pour que cette fonction endocrine soit reconnue. La découverte de la première sécrétion adipocytaire remonte à 1964 avec la découverte par Martin Rodbell de la lipoprotéine lipase [54]. Puis en 1985, le groupe de Bruce Spiegelman a montré que le tissu adipeux était la source principale d'adipsine [55]. Mais la prise de conscience de ce phénomène n'a eu vraiment lieu qu'en 1994 avec la découverte de la leptine par le groupe de Jeffrey Friedman [56]. Depuis, l'activité sécrétoire du tissu adipeux a été clairement établie et à ce jour, la sécrétion de plus d'une cinquantaine de molécules biologiquement actives a été attribuée au tissu adipeux. Certaines de ces molécules ont un statut d'hormone, mais le tissu adipeux produit également d'autres facteurs protéiques ou lipidiques. Toutes ces molécules peuvent agir de façon systémique ou seulement localement (action paracrine ou autocrine). Ces sécrétions sont classiquement regroupées sous le terme d'adipokines ou adipocytokines. Toutefois, il est important de mentionner que les termes adipokines ou adipocytokines définissent des sécrétions issues exclusivement des adipocytes. Parmi le nombre considérable de sécrétions, la part revenant aux sécrétions de l'adipocyte semble faible. Seul 1/3 des sécrétions d'adipokines serait imputables à l'adipocyte. Différentes études montrent en effet que la fraction du stroma vasculaire, plus particulièrement les macrophages qui sont en nombre important dans le tissu adipeux des sujets obèses, sont responsable de la majorité des sécrétions du tissu adipeux [57].

Certaines molécules sont synthétisées strictement par les adipocytes ou les cellules de la fraction du stroma vasculaire et d'autres par les deux. Toutes ces molécules affectent la plupart des grandes fonctions de l'organisme :

- le métabolisme lipidique,
- la régulation de la balance énergétique et de la prise alimentaire,
- les réponses immunitaires,
- la sensibilité à l'insuline,
- le remodelage du tissu adipeux et l'angiogenèse,
- l'hémostase,
- la régulation de la fonction vasculaire et de la pression artérielle.

Il faut noter que les sécrétions d'adipokines mais également de cytokines ne sont pas équivalentes selon les dépôts de tissu adipeux. Certaines adipokines telles que la leptine seraient synthétisées principalement par le tissu adipeux sous-cutané [58], alors que d'autres seraient produites par le tissu adipeux viscéral. De plus, l'augmentation de la masse du tissu adipeux induit des modifications de son activité sécrétoire [59,60]. En effet, dans l'obésité, les sécrétions de cytokines du tissu adipeux, issues des adipocytes hypertrophiques et des cellules inflammatoires infiltrant le tissu adipeux, contribuent à la mise en place d'un état pro-inflammatoire chronique à bas bruit.

LE TISSU ADIPEUX AU COURS DE LA PRISE DE POIDS ET CHEZ L'OBÈSE

a) Le concept d'expansion limitée

Il a longtemps été pensé que le tissu adipeux, organe du corps humain présentant le plus grand potentiel à croître et à décroître, pouvait grossir sans aucune limitation, lorsque l'individu était soumis à une balance énergétique positive. Néanmoins, depuis ces 10 dernières années, le concept d'une expansion limitée du tissu adipeux a émergé et semblerait pouvoir expliquer les anomalies métaboliques associées à l'obésité [61-64].

Selon cette hypothèse, le tissu adipeux ne serait pas capable de stocker efficacement les lipides et de recruter de nouveaux adipocytes pour faire face à l'afflux de lipides. Ceci entraînerait la présence importante d'adipocytes hypertrophiques qui serait associée à la mise en place de deux phénomènes contribuant aux anomalies métaboliques de la prise de poids [64] :

- Un défaut de stockage des lipides par l'adipocyte : Les adipocytes hypertrophiques soumis à des apports excessifs fréquents seraient moins capables de stocker les lipides, conduisant donc à une fuite («spill-over») de lipides dans la circulation, augmentant ainsi la concentration des acides gras libres. Les autres organes tels que le foie, le muscle ou le pancréas seraient donc soumis à des excursions lipidiques prolongées, engendrant le stockage de ces lipides dans ces organes non prévus à cet effet. L'accumulation ectopique de ces lipides entraînerait la mise en place de l'insulino-résistance et, à plus long terme, le diabète de type 2 selon le mécanisme de lipotoxicité.
- Des sécrétions d'adipokines et/ou de cytokines pro-inflammatoires modifiées : Les sécrétions de certaines adipokines par les adipocytes mais également d'autres cellules

résidentes du tissu, principalement des cellules immunitaires, pourraient être altérées lorsque l'adipocyte est hypertrophique. Le large champ d'action de ces molécules sur le métabolisme du glucose et sur le métabolisme lipidique contribuerait à maintenir et à accentuer le dysfonctionnement des adipocytes et les anomalies métaboliques associées, limitant ainsi le développement harmonieux du tissu adipeux lors de la prise de poids.

Les causes du défaut de développement du tissu adipeux ne sont pas encore complètement élucidées, mais, les scientifiques du domaine incriminent de plus en plus le micro-environnement tissulaire de l'adipocyte qui pourrait conditionner le développement harmonieux du tissu et sa fonction [65,66]. En condition normale, un réel remodelage du tissu adipeux prendrait place au cours des processus de prise de poids. Des altérations de ce remodelage pourraient limiter l'expansion du tissu. Cette notion de remodelage englobe, à l'heure actuelle, des processus d'angiogenèse, de remodelage de la matrice extracellulaire mais aussi d'infiltration du tissu par des cellules inflammatoires [67]. La description de ces processus est complexe étant donné leur inter-dépendance étroite.

b) Remodelage péri-adipocytaire

L'angiogenèse : L'angiogenèse et l'adipogenèse sont des processus étroitement liés, ce qui explique que l'angiogenèse soit un des phénomènes qui puissent participer à limiter le processus d'expansion du tissu adipeux. En effet, afin de subvenir aux besoins en nutriments et en oxygène du tissu en développement, le réseau vasculaire va s'intensifier. Il a été montré chez le rongeur que l'inhibition de l'angiogenèse réduisait l'expansion du tissu adipeux et diminuait les anomalies métaboliques associées [68-70]. L'un des éléments initiateur de l'angiogenèse est l'hypoxie, qui conduit à une baisse de la pression partielle en oxygène au niveau tissulaire et cellulaire. L'hypertrophie cellulaire du tissu adipeux pourrait être responsable d'un état aigu d'hypoxie, lié à une augmentation de l'espace de diffusion de l'oxygène dans le tissu [71]. Chez l'obèse, il a été démontré que le débit sanguin du tissu adipeux était diminué [72], suggérant que les apports en oxygène et nutriments aux adipocytes devaient être inférieurs à ceux rencontrés chez une personne mince. Des mesures directes de l'oxygénation des tissus ont également mis en évidence une baisse de la pression partielle en oxygène ainsi qu'une diminution de la densité capillaire du réseau vasculaire d'individus obèses. Il est à noter que la pression partielle en oxygène est inversement corrélée aux marqueurs pro-inflammatoires, suggérant que l'hypoxie induite par l'hypertrophie adipocytaire pourrait non seulement limiter l'expansion du tissu adipeux mais aussi favoriser l'état inflammatoire associé à l'obésité [67,73]. Des anomalies dans la mise en place de ces processus angiogéniques pourraient alors concourir à limiter le développement du tissu adipeux, en freinant le recrutement de nouveaux adipocytes. L'origine de ces anomalies reste encore à identifier. Néanmoins, on peut penser que ces anomalies pourraient être liées aux modifications des sécrétions du tissu adipeux lorsque les adipocytes sont hypertrophiques. En effet, le tissu adipeux sécrète tout un ensemble de facteurs pro- et anti-angiogéniques susceptibles de réguler les processus d'angiogenèse (Ang-1 ou 2 (angiopéptine 1 ou 2), récepteur Tie-2). Par exemple, le tissu adipeux synthétise et sécrète le VEGF (Vascular endothelial growth factor) qui est le facteur pro-angiogénique initiateur du processus d'angiogenèse. De plus, il a été démontré que certaines adipokines, telles que la leptine ou l'adiponectine, peuvent intervenir dans l'angiogenèse [61]. La modification des niveaux de sécrétion de ces molécules pourrait donc contribuer à limiter l'angiogenèse.

Le remodelage de la matrice extracellulaire : L'organisation architecturale du tissu adipeux est devenue récemment un sujet de recherche spécifique. En effet, l'observation microscopique de la structure du tissu adipeux d'individus obèses a permis de mettre en évidence des dépôts de fibrose au sein de ce tissu, suggérant que des modifications de la matrice pouvaient être associées à des modifications de la masse du tissu adipeux. Une étude de l'équipe du Pr. Clément a mis en évidence que ces dépôts de fibrose sont plus importants au niveau du tissu adipeux viscéral que du tissu adipeux sous-cutané chez les individus obèses [74]. De plus, la même étude a mis en évidence que les dépôts de fibrose n'étaient pas équivalents quantitativement et qualitativement selon les dépôts de tissu adipeux. En effet, le tissu adipeux sous-cutané présente de larges faisceaux de fibres collagènes traversantes alors que la fibrose du tissu adipeux épiploïque se présente sous la forme de faisceaux plus fins entourant des structures lobulaires. La quantité de fibrose du tissu adipeux viscéral est associée négativement à la concentration de triglycérides et à la taille cellulaire des adipocytes. Ceci suggère que la fibrose dans le tissu adipeux épiploïque pourrait limiter la taille des adipocytes. Enfin, cette même étude [74] a également mis en évidence que la quantité de fibrose du tissu adipeux sous-cutané était corrélée négativement à la perte de masse grasse chez des individus obèses après chirurgie bariatrique. Les auteurs suggèrent donc que la matrice extracellulaire pourrait contribuer à limiter la perte de masse grasse.

D'autres études ont comparé les transcriptomes des tissus adipeux de sujets minces et obèses, analysés par puces à ADN, et ont mis en évidence de grandes différences concernant les gènes liés à la matrice extracellulaire, dont l'expression était fortement corrélée à l'indice de masse corporelle ainsi qu'à plusieurs marqueurs de l'inflammation [75]. Dans cette même étude [75], il a été démontré qu'une perte de poids drastique s'accompagnait de la modification de l'expression génique de plus de 200 gènes en lien avec la matrice extracellulaire et son remodelage. Chez le rongeur, une étude en cinétique de prise de poids a permis de mettre en évidence que cette dernière s'accompagnait de dépôts de collagène dans le tissu adipeux et de l'apparition de marqueurs pro-inflammatoires [76]. Des études de surnutrition chez l'homme ont également mis en évidence des modifications de l'expression de gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire dans le tissu adipeux [77,78]. Une de ces études s'est principalement intéressée au collagène VI [79]. Elle a mis en évidence la présence de ce collagène dans le tissu adipeux chez l'homme, et montré que son niveau d'expression était corrélé à l'indice de masse corporelle et l'importance de la masse grasse. De plus, les sujets ayant les niveaux d'expression du collagène VI les plus élevés étaient ceux qui possédaient le plus de tissu adipeux viscéral et le plus de marqueurs inflammatoires.

Toutes ces études suggèrent que l'obésité s'accompagne d'une accumulation de collagène dans le tissu adipeux, qui pourrait nuire à l'élasticité du tissu et comprimer ainsi les adipocytes déjà hypertrophiés. En effet, bien que la matrice extracellulaire permette aux adipocytes de maintenir leur intégrité face à la pression de la gouttelette lipidique, des dépôts matriciels excessifs entraîneraient une rigidité de l'environnement péri-adipocytaire. La matrice extracellulaire pourrait alors exercer des forces de compression sur l'adipocyte induisant un stress mécanique, limitant le développement ou l'expansion du tissu adipeux en période de balance énergétique positive.

Infiltration de cellules immunitaires : Il est important de rappeler que l'obésité est actuellement considérée comme une maladie inflammatoire chronique à bas bruit. Les

individus obèses présentent des concentrations circulantes élevées de certains marqueurs pro-inflammatoires pouvant être à l'origine d'anomalies métaboliques associées à la prise de poids. Plusieurs tissus peuvent être responsables de ces sécrétions. Classiquement, le foie et les organes lymphoïdes sont considérés comme étant les principaux organes responsables du niveau global d'inflammation. Cependant, plusieurs données récentes laissent à penser que le tissu adipeux est en fait le principal tissu à incriminer [80,81]. En effet, les adipocytes et les cellules inflammatoires présentes dans la fraction du stroma vasculaire du tissu adipeux sont capables de synthétiser des molécules pro-inflammatoires telles que le TNF α ou l'IL6. La mise en évidence d'une infiltration importante de cellules inflammatoires chez les individus obèses, suggère l'implication de ces cellules dans la mise en place et le maintien de cette inflammation à bas bruit [82]. Deux études parues en 2003 [83,84], ont démontré que le développement du tissu adipeux s'accompagnait d'une infiltration macrophagique. Cette infiltration est corrélée à l'indice de masse corporelle mais également à l'hypertrophie adipocytaire. La perte de poids s'accompagne d'une réduction drastique du nombre de cellules inflammatoires [85]. Ces premières données ont donc suggéré le rôle important des cellules inflammatoires dans le remodelage du tissu adipeux lors de la prise de poids. Depuis, de nombreuses études se sont intéressées aux causes de l'infiltration macrophagique, à son rôle, et aux conséquences de la présence de macrophages dans le tissu adipeux.

L'observation microscopique du tissu adipeux a permis de mettre en évidence que les macrophages infiltrés se concentraient autour des adipocytes hypertrophiques, formant ainsi des structures caractéristiques en couronne. A la vue de ces résultats, l'équipe de Cinti a émis l'hypothèse que les macrophages étaient recrutés dans le tissu adipeux lors de son développement pour permettre l'élimination des volumineux adipocytes hypertrophiques qui seraient des cellules en voie de mort cellulaire [86]. L'étude menée par Strissel *et al.* [76] renforce ces données. Une étude, sur un modèle transgénique inductible de lipotrophie, a permis de confirmer que la mort massive des adipocytes s'accompagnait d'une rapide accumulation de macrophages [87]. Lors de la mort des adipocytes, les macrophages phagocyteraient donc les membranes cellulaires mais également la gouttelette lipidique. Bien que les mécanismes initiateurs de l'infiltration macrophagique lors de la prise de masse grasse ne soient pas encore tous complètement élucidés, il a été mis en évidence que les adipocytes hypertrophiques «en souffrance» présenteraient des sécrétions altérées, notamment des chémokines pro-inflammatoires, telles que MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein 1), capables de recruter les monocytes circulants et d'induire leur infiltration dans le tissu adipeux [82]. A ce jour, MCP-1 et son récepteur CCR2 (Chemokine (C-C motif) receptor 2) représentent la principale voie identifiée de recrutement des macrophages dans le tissu adipeux. Son invalidation chez le rongeur diminue le recrutement des macrophages et limite également l'insulino-résistance associée à un régime riche en lipides.

Une autre cause potentielle de l'initiation du recrutement des macrophages serait l'hypoxie liée à l'hypertrophie adipocytaire. Des études ont mis en évidence que des adipocytes en culture soumis à une hypoxie sécrétaient des molécules inflammatoires (MIF : Macrophage migration inhibitory factor) capables de recruter des macrophages [88].

Les acides gras qui échappent à la voie de ré-estérification («spill-over») peuvent également jouer un rôle dans le recrutement des macrophages [89]. En effet, en se liant aux

récepteurs TLR4 (Toll-like receptor 4) des cellules inflammatoires déjà présentes dans le tissu, ils sont capables d'activer une réponse pro-inflammatoire, conduisant donc à un relargage accru de cytokines pro-inflammatoires. De cette manière, les macrophages déjà sur place auto-entretiennent l'infiltration macrophagique du tissu adipeux. Notons que certaines sécrétions macrophagiques comme le TNF α , possèdent une action lipolytique conduisant la libération accrue d'acides gras capables de stimuler les cellules inflammatoires via leur récepteur TLR4, enclenchant ainsi un cercle vicieux.

Outre le nombre total de macrophages, leur phénotype est également un élément déterminant. En effet, il apparaît que les macrophages peuvent exister sous deux principales formes dans le tissu : M1 ou M2. Le phénotype ou polarisation M2 correspond à un phénotype qualifié d'anti-inflammatoire, alors que la polarisation M1 représente un phénotype pro-inflammatoire. Il existerait un basculement (« switch ») de phénotype lors de la prise de poids, les macrophages passant du phénotype M2 au phénotype M1, avec sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires [90]. Inversement, lors de la perte de poids, qui est associée à de nettes améliorations métaboliques, le phénotype des macrophages bascule à nouveau vers le phénotype M2, diminuant ainsi les sécrétions de cytokines pro-inflammatoires.

En plus des macrophages, des études récentes indiquent que d'autres types de cellules immunitaires pourraient infiltrer le tissu adipeux et coordonner la réponse inflammatoire au sein de ce tissu. Certains types de lymphocytes T pourraient être présents dans le tissu avant même l'infiltration macrophagique. Ces données suggèrent que la réaction inflammatoire pourrait être coordonnée en premier lieu par les lymphocytes T puis par les macrophages [91].

Néanmoins, il est important de souligner que les études qui mettent en évidence une infiltration de cellules immunitaires ont été réalisées chez des individus obèses. Les études de surnutrition chez l'homme, qui permettent de mettre en évidence les mécanismes d'adaptation précoces au cours de la prise de poids, ne mettent généralement pas en évidence d'infiltration de cellules immunitaires au cours d'une prise de poids modérée [78,92], ni même de changement dans l'abondance d'autres types de cellules immunitaires. Il semble donc que l'infiltration par les cellules immunitaires, en particulier les macrophages, soit un élément relativement tardif au cours de la prise de poids et non un facteur causal ou initial dans le développement de la masse grasse [78].

Les processus, permettant le remodelage optimal du tissu adipeux lors de la prise de poids, ne sont pas encore clairement identifiés. Ce remodelage qui semble être un phénomène très coordonné et finement régulé, devrait permettre la constitution d'un environnement péri-adipocytaire propice à son fonctionnement. Il semblerait néanmoins, qu'en condition de prise de poids massive, ces mécanismes soient dépassés et puissent conduire à limiter l'expansion du tissu adipeux, à la fois en réduisant le recrutement de nouveaux adipocytes, mais également en favorisant la présence d'adipocytes hypertrophiques dysfonctionnels. A l'heure actuelle, les processus angiogéniques ainsi que le remodelage de la matrice extracellulaire sont les deux principaux phénomènes impliqués dans la limite de l'expansion de ce tissu. Les cellules inflammatoires infiltrées dans le tissu semblent également être des acteurs importants de ce phénomène.

- currently a renewed scientific interest for this tissue due to its possible therapeutic implications. White adipose tissue is the principal place of energy storage in the body. This tissue contributes to synthesize and hydrolyze triglycerides and also secretes adipokines. Its subcutaneous or visceral localisation gives it different properties. Adipose tissue and its ability to expansion play a key role in the complications of obesity. Numerous tissue dysfunctions might be involved like inflammation, hypoxia, abnormalities angiogenesis and abnormalities of remodeling of the extracellular matrix. This review reports the current set of physiological and pathophysiological aspects of adipose tissue whose knowledge is constantly changing.

Key-words: White adipose tissue, brown adipose tissue, brite adipose tissue, obesity, adipocyte, lipolysis, lipogenesis, inflammation, adipose tissue expansion, adipose tissue remodeling.

BIBLIOGRAPHIE

1. Van Marken Lichtenbelt W.D., J.W. Vanhommerig, N.M. Smulders et al : Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009, **360** : 1500-1508. - 2. Nedergaard J., T. Bengtsson, B. Cannon : Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, **293** : E444-E452. - 3. Cypess A.M., S. Lehman, G. Williams et al : Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009, **360** : 1509-1517. - 4. Mirbolooki M.R., C.C. Constantinescu, M.L. Pan et al : Quantitative assessment of brown adipose tissue metabolic activity and volume using 18F-FDG PET/CT and β 3-adrenergic receptor activation. *EJNMMI Res* 2011, **1** : 30. - 5. Orava J., P. Nuutila, M.E. Lidell et al : Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab* 2011, **14** : 272-279. - 6. Virtanen K.A., M.E. Lidell, J. Orava et al : Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009, **360** : 1518-1525. - 7. Hany T.F., E. Gharehpapagh, E.M., Kamel et al : Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002, **29** : 1393-1398. - 8. Giral M., F. Villarroya : White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions ? *Endocrinology* 2013. - 9. Smorlesi A., A. Frontini, A. Giordano et al : The adipose organ: white-brown adipocyte plasticity and metabolic inflammation. *Obes Rev* 2012, **13 Suppl 2** : 83-96. - 10. Becerril S., J. Gómez-Ambrosi, M. Martín et al : Role of PRDM16 in the activation of brown fat programming. Relevance to the development of obesity. *Histol Histopathol* 2013. - 11. Wu J., P. Cohen, B.M. Spiegelman : Adaptive thermogenesis in adipocytes : is beige the new brown? *Genes Dev* 2013, **27** : 234-250. - 12. Cinti S. : The adipose organ at a glance. *Dis Model Mech* 2012, **5** : 588-594. - 13. Wajchenberg B.L. : Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000, **21** : 697-738. - 14. Bjørndal B., L. Burri, V. Staalesen et al : Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. *J Obes* 2011, **2011** : 490650. - 15. Vague J. : The Degree of Masculine Differentiation of Obesity A factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 1956, **4** : 20-34. - 16. Després J.P. : Intra-abdominal obesity: an untreated risk factor for Type 2 diabetes and cardiovascular disease. *J Endocrinol Invest* 2006, **29** : 77-82. - 17. Després J.P., S. Moorjani, P.J. Lupien et al : Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins, and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* 1990, **10** : 497-511. - 18. Pouliot M.C., J.P. Després, A. Nadeau et al : Visceral obesity in men. Associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* 1992, **41** : 826-834. - 19. Després J.P., I. Lemieux, J. Bergeron et al : Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, **28** : 1039-1049. - 20. Snijder M.B., J.M. Dekker, M. Visser et al : Trunk fat and leg fat have independent and opposite associations with fasting and postload glucose levels: the Hoorn study. *Diabetes Care* 2004, **27** : 372-377. - 21. Van Pelt R.E., C.M. Jankowski, W.S. Gozansky et al : Lower-body adiposity and metabolic protection in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, **90** : 4573-4578. - 22. Martin M.L., M.D. Jensen : Effects of body fat distribution on regional lipolysis in obesity. *J Clin Invest* 1991, **88** : 609-613. - 23. Romanski S.A., R.M. Nelson, M.D. Jensen : Meal fatty acid uptake in adipose tissue: gender effects in nonobese humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000, **279** : E455-E462. - 24. Fujimoto T., R.G. Parton : Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, **3**. - 25. Tansey J.T., C. Sztalryd, E.M. Hlavin et al : The central role of perilipin a in lipid metabolism and adipocyte lipolysis. *IUBMB Life* 2004, **56** : 379-385. - 26. Tansey J.T., C. Sztalryd, J. Gruia-Gray et al : Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98** : 6494-6499. - 27. Kim

C.A., M. Delépine, E. Boutet et al : Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, **93** : 1129-1134. - **28. Curat C.A., A. Miranville, C. Sengenès et al** : From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004, **53** : 1285-1292. - **29. Miranville A., C. Heeschen, C. Sengenès et al** : Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 2004, **110** : 349-355. - **30. Sengenès C., K. Lolmède, A. Zakaroff-Girard et al** : Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* 2005, **205** : 114-122. - **31. Loftus T.M., M.D. Lane** : Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1997, **7** : 603-608. - **32. Lilla J., D. Stickens, Z. Werb** : Metalloproteases and adipogenesis: a weighty subject. *Am J Pathol* 2002, **160** : 1551-1554. - **33. Rosen E.D., C.J. Walkey, P. Puigserver et al** : Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000, **14** : 1293-1307. - **34. Ailhaud G.** : Molecular mechanisms of adipocyte differentiation. *J Endocrinol* 1997, **155** : 201-202. - **35. Spalding K.L., E. Arner, P.O. Westermark et al** : Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008, **453** : 783-787. - **36. Arner P., Spalding K.L.** : Fat cell turnover in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **396** : 101-104. - **37. Helledie T., M. Antonius, R.V. Sorensen et al** : Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J Lipid Res* 2000, **41** : 1740-1751. - **38. Ellis J.M., L.O. Li, P.C. Wu et al** : Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. *Cell Metab* 2010, **12** : 53-64. - **39. Takeuchi K., K. Reue** : Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009, **296** : E1195-E1209. - **40. Large V., O. Peroni, D. Letexier et al** : Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 2004, **30** : 294-309. - **41. Jakobsson A., R. Westerberg, A. Jacobsson** : Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* 2006, **45** : 237-249. - **42. Acheson K.J., Y. Schutz, T. Bessard et al** : Glycogen storage capacity and de novo lipogenesis during massive carbohydrate overfeeding in man. *Am J Clin Nutr* 1988, **48** : 240-247. - **43. Minehira K., V. Bettschart, H. Vidal et al** : Effect of carbohydrate overfeeding on whole body and adipose tissue metabolism in humans. *Obes Res* 2003, **11** : 1096-1103. - **44. Osborne T.F.** : Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* 2000, **275** : 32379-32382. - **45. Cianflone K., Z. Xia, L.Y. Chen** : Critical review of acylation-stimulating protein physiology in humans and rodents. *Biochim Biophys Acta* 2003, **1609** : 127-143. - **46. Langin D.** : Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *C R Biol* 2006, **329** : 598-607, discussion 653-655. - **47. Sengenès C., M. Berlan, I. De Glisezinski et al** : Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J* 2000, **14** : 1345-1351. - **48. Lafontan M., D. Langin** : Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 2009, **48** : 275-297. - **49. Cohen A.W., B. Razani, W. Schubert et al** : Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 2004, **53** : 1261-1270. - **50. Granneman J.G., H.P.H. Moore, R.L. Granneman et al** : Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem* 2007, **282** : 5726-5735. - **51. Hotamisligil G.S., P. Arner, J.F. Caro et al** : Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995, **95** : 2409-2415. - **52. Rydén M., E. Arvidsson, L. Blomqvist et al** : Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **318** : 168-175. - **53. Bastard J.P., M. Maachi, C. Lagathu et al** : Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006, **17** : 4-12. - **54. Rodbell M.** : Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 1964, **239** : 375-380. - **55. Cook K.S., D.L. Groves, H.Y. Min, et al** : A developmentally regulated mRNA from 3T3 adipocytes encodes a novel serine protease homologue. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, **82** : 6480-6484. - **56. Zhang Y., R. Proenca, M. Maffei et al** : Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994, **372** : 425-432. - **57. Fain J.N., D.S. Tichansky, A.K. Madan** : 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. *Metab Clin Exp* 2006, **55** : 1113-1121. - **58. Van Harmelen V., S. Reynisdottir, P. Eriksson et al** : Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 1998, **47** : 913-917. - **59. Lafontan M., M. Berlan** : Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* 2003, **24** : 276-283. - **60. Skurk T., C. Alberti-Huber, C. Herder et al** : Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, **92** : 1023-1033. - **61. Kim J.Y., E. Van de Wall, M. Laplante et al** : Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* 2007, **117** : 2621-2637. - **62. Tan C.Y., A. Vidal-Puig** : Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem Soc Trans* 2008, **36** : 935-940. - **63. Lionetti L., M.P. Mollica, A. Lombardi et al** : From chronic overnutrition to insulin resistance: the role of fat-storing capacity and inflammation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009, **19** : 146-152. - **64. Virtue S., A. Vidal-Puig** : Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010, **1801** : 338-349. - **65. Lee M.J. Y., Wu, S.K. Fried** : Adipose tissue remodeling

in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010, **13** : 371-376. - **66. Sun K., C.M. Kusminski, P.E. Scherer** : Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 2011, **121** : 2094-2101. - **67. Rutkowski J.M., K.E. Davis, P.E. Scherer** : Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J* 2009, **276** : 5738-5746. - **68. Rupnick M.A., D. Panigrahy, C.Y. Zhang et al** : Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99** : 10730-10735. - **69. Fukumura D., A. Ushiyama, D.G. Duda et al** : Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res* 2003, **93** : e88-e97. - **70. Bråkenhielm E., R. Cao, B. Gao et al** : Angiogenesis inhibitor, TNP-470, prevents diet-induced and genetic obesity in mice. *Circ Res* 2004, **94** : 1579-1588. - **71. Brahimi-Horn M.C., J. Chiche, J. Pouyssegur** : Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr Opin Cell Biol* 2007, **19** : 223-229. - **72. Summers L.K., J.S. Samra, S.M. Humphreys et al** : Subcutaneous abdominal adipose tissue blood flow: variation within and between subjects and relationship to obesity. *Clin Sci* 1996, **91** : 679-683. - **73. Ye J., Z. Gao, J. Yin et al** : Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, **293** : E1118-1128. - **74. Divoux A., J. Tordjman, D. Lacasa et al** : Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes* 2010, **59** : 2817-2825. - **75. Henegar C., J. Tordjman, V. Acharid et al** : Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol* 2008, **9** : R14. - **76. Strissel K.J., Z. Stancheva, H. Miyoshi et al** : Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007, **56** : 2910-2918. - **77. Shea J., C.R. French, J. Bishop et al** : Changes in the transcriptome of abdominal subcutaneous adipose tissue in response to short-term overfeeding in lean and obese men. *Am J Clin Nutr* 2009, **89** : 407-415. - **78. Alligier M., E. Meugnier, C. Debard et al** : Subcutaneous adipose tissue remodeling during the initial phase of weight gain induced by overfeeding in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, **97** : E183-E192. - **79. Pasarica M., B. Gowronka-Kozak, D. Burkett et al** : Adipose tissue collagen VI in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, **94** : 5155-5162. - **80. Hotamisligil G.S., N.S. Shargill, B.M. Spiegelman** : Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993, **259** : 87-91. - **81. Trayhurn P., I.S. Wood** : Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004, **92** : 347-355. - **82. Weisberg S.P., D. Hunter, R. Huber et al** : CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 2006, **116** : 115-124. - **83. Weisberg S.P., D. McCann, M. Desai et al** : Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003, **112** : 1796-1808. - **84. Xu H., G.T. Barnes, Q. Yang et al** : Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003, **112** : 1821-1830. - **85. Canello R., C. Henegar, N. Viguier et al** : Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005, **54** : 2277-2286. - **86. Cinti S., G. Mitchell, G. Barbatelli et al** : Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005, **46** : 2347-2355. - **87. Pajvani U.B., M.E. Trujillo, T.P. Combs et al** : Fat apoptosis through targeted activation of caspase 8 : a new mouse model of inducible and reversible lipoatrophy. *Nat Med* 2005, **11** : 797-803. - **88. Hosogai N., A. Fukuhara, K. Oshima et al** : Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 2007, **56** : 901-911. - **89. Itoh M., T. Suganami, R. Hachiya et al** : Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *Int J Inflamm* 2011, 2011 : 720926. - **90. Lumeng C.N., J.L. Bodzin, A.R. Saltiel** : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007, **117** : 175-184. - **91. Nishimura S., I. Manabe, M. Nagasaki et al** : CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 2009, **15** : 914-920. - **92. Tam C.S., A. Viardot, K. Clément et al** : Short-term overfeeding may induce peripheral insulin resistance without altering subcutaneous adipose tissue macrophages in humans. *Diabetes* 2010, **59** : 2164-2170.

1 **1)** Dairy biomarker divergence.

2

3 **2)** Benjamin J Jenkins^a; Kévin Seyssel^b; Zsuzsanna Ament^a; James A. West^a; Keith
4 Summerhill^a; Maud Alligier^b; Martine Laville^b; Martin Ronis^c; Albert Koulman^a.

5

6 ^aMedical Research Council Human Nutrition Research, Elsie Widdowson Laboratory,
7 Fulbourn Road, Cambridge, CB1 9NL , United Kingdom. Affiliated with the University
8 of Cambridge.

9 ^bInstitut Nationale de la Recherche et de la Santé Médicale Unité 1060, Laboratoires
10 CarMeN et Centre Européen pour la Nutrition et la Santé, Université Lyon 1, 69600
11 Oullins, France, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre
12 Hospitalier Lyon-Sud, 69310, Pierre-Bénite, France.

13 ^cCollege of Medicine, Department of Pharmacology & Experimental Therapeutics,
14 Louisiana State University Health Sciences Centre 1901 Perdido Str., New Orleans,
15 United States of America.

16

17 Benjamin.Jenkins@mrc-hnr.cam.ac.uk; Kevin.Seyssel@gmail.com;
18 Zsuzsanna.Ament@mrc-hnr.cam.ac.uk; James.West@mrc-hnr.cam.ac.uk;
19 Keith.Summerhill@mrc-hnr.cam.ac.uk; Maud.Alligier@chu-lyon.fr;
20 Martine.Laville@univ-lyon1.fr; MRonis@lsuhsc.edu; Albert.Koulman@mrc-
21 hnr.cam.ac.uk.

22

23 **3)** Author to whom correspondence should be addressed: Albert Koulman, MRC HNR,
24 Elsie Widdowson Laboratory, Fulbourn Road, Cambridge, CB1 9NL, United Kingdom;
25 E-Mail: albert.koulman@mrc-hnr.cam.ac.uk; Tel.: +44 (0) 1223 426356.

26 ABSTRACT

27

28 The circulating levels of odd chain saturated fatty acids (OCS-FAs) have long
29 been attributed to the consumption of ruminant / dairy fat. To date all experimental
30 evidence has been based on association studies and there is no direct evidence. To
31 investigate the dietary contributions of OCS-FAs we studied the effect of increased
32 ruminant / dairy fat intake on the plasma and serum fatty acid profiles in both human
33 and animal models. We primarily focus on the widely used markers: pentadecanoic
34 (C15:0) and heptadecanoic (C17:0) acids. If OCS-FAs (pentadecanoic acid and
35 heptadecanoic acid) are true markers of ruminant / dairy fat intake, their levels are
36 expected to increase with an increased intake of dairy or ruminant fat.

37 Twenty six healthy male human volunteers were recruited and their diets were
38 altered for fifty-six days. Their average saturated and monounsaturated fat intake
39 was increased by 70 grams per day by the addition of ruminant fat comprising 100
40 grams of cheese, 20 grams of butter. In addition, 40 grams of almonds were also
41 included in order to provide a more balanced diet. Plasma samples were collected
42 on the first, and last study day, and their OCS-FA levels were compared.
43 Interestingly, C15:0 showed a significant increase ($P=0.031$), however there was no
44 significant difference in the concentrations of C17:0 ($P=0.951$) due to the feeding
45 intervention.

46 This discrepancy between C15:0 and C17:0 was further studied in animals.
47 Five groups of male Sprague-Dawley (SD) rats were subjected to isocaloric 70%
48 high-fat diets, each group of animals where fed with increasing amounts of beef
49 tallow in their diets, from 0% to 11.7%. Serum C15:0 concentration showed a linear

50 relationship with the dietary composition of C15:0, whereas plasma concentrations of
51 C17:0 did not.

52 Taken together our results indicate that C15:0 is a good biomarker, whereas
53 C17:0 does not linearly correlate and should not be used to infer ruminant fat intake.
54 These results strongly suggest that these two fatty acids are not tantamount and
55 C17:0 may have other metabolic processes involved in either its endogenous
56 synthesis or metabolism.

57

58 **4) Dairy; Biomarker; Pentadecanoic; Heptadecanoic; fatty acid.**

59

60 **5) OCS-FAs - odd chain saturated fatty acids; C15:0 - pentadecanoic acid; C17:0 -**
61 **heptadecanoic acids; MCT - medium chain triglyceride oil; GC-MS – gas**
62 **chromatography mass spectrometry;**

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75 1.1 INTRODUCTION

76

77 Recent findings have shown a negative association between circulating odd
78 chain saturated fatty acids (OCS-FAs) and chronic disease risk, specifically coronary
79 heart disease (CHD) [1] and type 2 diabetes (T2D) [2]. The provenance of circulating
80 OCS-FAs has long been attributed to diet [3] [4] [5] [6], specifically ruminant fat (both
81 dairy and meat fat) as the main contributor in a typical western diet [7] [8]. Since OCS-
82 FAs are produced by the rumen microbiome they are incorporated into the whole
83 lipidome of the host animal where they are utilised in both the production of dairy fat
84 and fat reserves [9].

85 All the current evidence for the dietary source of OCS-FAs are based on
86 associations between data from dietary assessment methods and measured levels in
87 plasma and tissues [2]. However, further proof of these associations, for instance, by
88 ruminant fat supplementation or intervention has been lacking. With many studies
89 showing an inverse association of OCS-FA with disease risk and people expecting that
90 these studies should lead to altered public health messages, it is important to show the
91 direct effect of ruminant fat supplementation on the plasma or serum fatty acid profile.

92 With regards to fat overfeeding studies in humans, it has been shown that
93 detectable changes in the plasma lipid profiles require the overfeeding protocol to be
94 a minimum of 10 days [10] [11] [12]. This is the time required for the remodelling of
95 tissue lipids, which in turn corresponds with plasma lipid levels and dietary
96 interventional effects. We studied human plasma samples from volunteers, which
97 were collected prior and after a medium term (56 days) fat overfeeding study, designed
98 for excessive ruminant fat supplementation (44 g of ruminant fat / day) [13] calculated
99 to double the amount of a typical ruminant fat intake [3] [7] [14] [15] [6]. In a second

100 study, rat serum samples were collected during a 3 week intervention study. Rats, 6-
101 9 animals per group, were subjected to different isocaloric high-fat diets with increasing
102 ruminant fat content from 0 to 11.7%, to test the consistency of the conventional
103 ruminant fat biomarkers (C15:0 and C17:0) with dietary intake. We hypothesise that
104 OCS-FAs (pentadecanoic and heptadecanoic acids) are true intake markers of
105 ruminant fat. Therefore, the measured serum / plasma levels must show a significant
106 linear increase with an increased intake of ruminant fat.

107

108

109 **2.1 EXPERIMENTAL DESIGN AND METHODS**

110 **2.2 HUMAN STUDY**

111 **2.2.1 PARTICIPANTS**

112 Twenty-six healthy males were involved in this part of the study. Subjects were
113 recruited for an overfeeding trial which was originally setup to examine the effect of
114 overall fat increase [13], these previously collected samples were re-analysed to study
115 OCS-FAs. Following screening and preliminary visits, selected participants were
116 healthy with stable body weight and no family history of diabetes. All the participants
117 gave signed consent following the explanation of the experiment protocol including the
118 study objectives, instructions and possible risks. The protocol was approved by the
119 ethics committee of Lyon Sud-Est according to the French 'Huriet-Serusclet' law and
120 the Second Declaration of Helsinki. The study was registered as n. NCT00905892 at
121 www.clinicaltrials.gov.

122

123 **2.2.2 OVERFEEDING PROTOCOL**

124 As previously described [13] [16] [17], the subjects were submitted to fifty-six
125 days of overfeeding, where they were expected to eat in excess of their usual diet of
126 760 kcal / day, (3180 kJ / day). The additional energy intake was derived from high fat
127 sources, which included 100 grams of Emmental cheese, 20 grams of butter (unsalted)
128 and 40 grams of almonds; almonds are a source of unsaturated fat to prevent any
129 negative health risks from the high saturated fat supplementation. The additional fat
130 sources represented an increase of 70 grams of lipids with the composition of saturated
131 fat of 46.3%, and that of monounsaturated fat at 44.7% (see table.1.). During the study,
132 the subjects were requested to maintain their usual eating behaviour and also to
133 maintain their regular level of physical activity. To evaluate the adherence to the
134 intervention the subjects completed a dietary questionnaire for five days before the
135 study and twice during the overfeeding period. Physical activity was also monitored
136 during these five day periods using RT3 accelerometers.

137

138 **2.2.3 METABOLIC EXPLORATIONS**

139 After an overnight fast, subjects were weighed and their height and waist
140 circumference were measured. Fasting blood samples were drawn for analysis of
141 hormones and plasma metabolites. Glycaemia was measured using the hexokinase
142 method (Roche Diagnostics). Plasma insulin was measured by RIA
143 (immunoradiometric assay kit; IRE-Medgenix). Total cholesterol, triglycerides, and
144 non-esterified fatty acids (NEFAs) were determined by enzymatic methods (NEFA C
145 kit; Wako Parel Chemicals). Energy expenditure was evaluated by indirect calorimetry
146 measurements performed during 60 minutes (Deltatrac Datex) in the fasting state.

147 Body composition was determined by whole-body dual-energy x-ray
148 absorptiometry (Hologic, Inc, Bedford, Massachusetts). Subcutaneous and visceral

149 adipose tissue volume was assessed by magnetic resonance imaging (MRI)
 150 (Magnetom Symphonie 1.5 Tesla; Siemens AG, Munich, Germany) using single-slice
 151 image at the L2-L3 disk level.

152

153 **2.3 ANIMAL STUDY**

154 **2.3.1 EXPERIMENTAL DESIGN**

155 Male Sprague-Dawley rats (Harlan, Indianapolis, USA) were housed under
 156 standard conditions according to the Association for Assessment and Accreditation of
 157 Laboratory Animal Care (AAALAC). All experimental procedures were ethically
 158 approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of
 159 Arkansas for Medical Science. Animals were overfed using one of five experimental
 160 diets (n = 6-9 per group) via an intragastric cannula at 17% above matched growth of
 161 *ad libitum* chow diet rats, as described previously [18] [19]. Animals had access to
 162 water *ad libitum* throughout the experiment. Each isocaloric diet (890 kcal/L) was
 163 administered at 220 kcal/Kg per day with the composition 70% fat, 11% carbohydrates
 164 and 19% whey protein with identical vitamin and mineral content. The fatty acid
 165 composition of each diet has been previously reported [19] and the dietary sources of
 166 the lipids are show in Table.1.

167

168 ***Table.1. Fat source composition of the animal feed. MCT: medium chain***
 169 ***triglyceride oil.***

170

| Diet | Corn oil | MCT oil | Beef tallow | Total fat |
|------|----------|---------|-------------|-----------|
| 1 | 70% | 0% | 0% | 70% |
| 2 | 50% | 16.4% | 3.6% | 70% |

| | | | | |
|---|-----|-------|-------|-----|
| 3 | 35% | 28.7% | 6.3% | 70% |
| 4 | 20% | 41% | 9% | 70% |
| 5 | 5% | 53.3% | 11.7% | 70% |

171

172

173 **2.4 ANALYTICAL PROCEDURES**

174 **2.4.1 MATERIALS**

175 Chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Company Ltd,
176 Dorset, UK). All solvents were of HPLC grade.

177

178 **2.4.2 ANALYTE EXTRACTION**

179 Samples were extracted using the chloroform: methanol: water extraction as
180 previously described by Folch *et al* [20]. Briefly, chloroform: methanol solution (2:1, 1
181 mL) was added to 100 μ L of plasma or serum, the samples were vortexed and
182 sonicated for 15 minutes. Water (400 μ L) was added to each sample, followed by
183 further vortexing then sonication (15 min), and additional vortexing to ensure
184 maximum recovery. Samples were centrifuged (14 680 rpm, 15 min) and the
185 resulting aqueous and organic layers were separated and dried under a gentle
186 stream of nitrogen.

187

188 **2.4.3 FATTY ACID METHYL ESTER (FAME) PREPARATION**

189 For the analysis of total fatty acids, the samples were derivatised as described
190 previously [21]. To the dried organic extracts; boron trifluoride in methanol (14%, 125
191 μ L), chloroform: methanol (1:1, 100 μ L) and D25-tridecanoic acid in chloroform (100
192 μ L, 200 μ M) were added. The mixture was thoroughly vortexed, sonicated (30 min)

217 Several statistical approaches were utilised, these included univariate and
 218 descriptive statistics. Comparisons between time points (baseline at day 0 vs day 56)
 219 in the human intervention study were performed using a paired t-test. ANOVA was
 220 performed using MetaboAnalyst 3.0 (TMIC, Alberta, Canada) to assess differences
 221 amongst animal groups. Descriptive statistics were used, with respect to the
 222 assessment of the fatty acid change. A value of $P \leq 0.05$ was considered significant.

223

224

225 4.1 RESULTS

226 4.1.1 HUMAN STUDY

227 Firstly, the fat content of the additional foodstuffs was examined, based on
 228 previously reported data [8]. Overall, the daily intake of OCS-FA C15:0 from cheese,
 229 butter and almonds is 525 mg each day, and is 1.9 times higher compared to C17:0
 230 (see Table.2.).

231

232 ***Table.2. The concentration of pentadecanoic acid (C15:0) and***
 233 ***heptadecanoic acid (C17:0) for each fat source consumed during the study***
 234 ***intervention as previously reported [8].***

235

| | Cheese | Butter | Almonds | Intervention |
|---------|---------|---------|---------|--------------|
| | mg/100g | mg/100g | mg/100g | mg/day |
| (C15:0) | 350 | 880 | 8 | 529 |
| (C17:0) | 200 | 330 | 30 | 278 |

236

237

238 Having examined the dietary sources of OCS-FAs, the plasma fatty acid
 239 concentrations were measured by GC-MS (see Table.3.). It is apparent from this
 240 table, that C15:0 did increase with approximately 10% due to supplementation and
 241 that this increase was significant. However C17:0 did not show a real increase (less
 242 than 1%) and this was not significantly different from baseline. These results are not
 243 in line with the commonly accepted idea that both of the OCS-FAs, C15:0 and C17:0
 244 are markers for diary fat consumption [3] [1] [4] [22] [23] [24] [25] [26] [2] [27].

245

246 **Table.3. The OCS-FA concentrations of human plasma samples analysed**
 247 **by GC-MS at the start (day = 0) and at the end of the intervention (day = 56). The**
 248 **diet increase of each of the fatty acids due to the intervention is 30% above**
 249 **baseline. Values are given with \pm standard error of the mean. A value of $P \leq 0.05$**
 250 **was considered significant.**

251

| | % day = 0 | % day = 56 | Average % increase | P-value |
|---------|--------------------|--------------------|-----------------------|---------|
| (C15:0) | 0.097 \pm 0.0029 | 0.106 \pm 0.0043 | 9.98 | 0.031* |
| (C17:0) | 0.144 \pm 0.0038 | 0.145 \pm 0.0034 | 0.16 | 0.951 |

252

253

254 We aimed to challenge the results by examining the data reported through the
 255 dietary questionnaires to determine if changes in the habitual diets of the participants
 256 lead to an increase in the intake of these OCS-FAs from other sources besides
 257 ruminant fat. From the table (see Table.4.) it is clear that the participants maintained

258 their habitual diet and that the overfeeding intervention led to a significant increase of
259 the ruminant fats containing OCS-FAs.

260

261 **Table.4. The dietary assessment of the human participants throughout**
262 **the time course (day 0 to day 56) of the intervention showing that the intake of**
263 **ruminant fat has significantly increased due to the supplementation, 234.1 to**
264 **308.1 grams per day. This table also confirms that the participant habitual diet**
265 **remained compositionally unchanged throughout the intervention. A value of**
266 **$P \leq 0.05$ was considered significant.**

267

| | Day 0 | Day 56 | P-value |
|-------------------------------------|--------------|--------------|---------|
| Energy intake (kcal/day) | 2236 ± 71 | 3040 ± 76 | <0.001 |
| Protein intake (g/day) | 92.1 ± 3.1 | 127.0 ± 3.0 | <0.001 |
| Carbohydrate intake (g/day) | 254.3 ± 8.4 | 270.6 ± 10.9 | 0.054 |
| Lipid intake (g/day) | 93.6 ± 4.7 | 160.3 ± 5.1 | <0.001 |
| Saturated fatty acid (g/day) | 35.7 ± 2.1 | 62.9 ± 1.8 | <0.001 |
| Mono-unsaturated fatty acid (g/day) | 28.5 ± 1.7 | 52.1 ± 1.9 | <0.001 |
| Poly-unsaturated fatty acid (g/day) | 11.2 ± 0.8 | 19.6 ± 1.1 | <0.001 |
| Ruminant fat intake (g/day) | 234.1 ± 23.7 | 308.1 ± 23.7 | <0.001 |

268

269

270 **4.1.2 ANIMAL STUDY**

271 Five groups of rats were subjected to individual isocaloric 70% high-fat diets,
272 where the composition of the fat in each diet had increasing amounts of beef tallow
273 from 0% to 11.7% (see Table.1.). This range covers the expected variation of
274 ruminant fat in the human diet (see Table.4.). Beef tallow has a fatty acid
275 composition representative of the ruminant animal diet, including any fatty acids

276 produced by the rumen microbiome and therefore is suitable for OCS-FA diet
277 biomarker studies.

278 To study the relationship between the diet composition and the serum
279 composition of OCS-FAs, in order to establish the validity of these being legitimate
280 biomarkers of ruminant fat intake, we compared C15:0 and C17:0 concentrations
281 between the diets and the serum levels given that odd chain fatty acid composition of
282 the dietary components has been well published [19] [28] [29] [30]. The OCS-FA
283 composition associated with these diets, in particular that of corn oil, was confirmed
284 in-house using the GC-MS platform. The OCS-FA compositions in both diet and
285 serum for each animal group are shown in Table 5.

286

287 ***Table.5. Composition of odd chain saturated fatty acids of the five 70%***
288 ***high-fat diets and mean serum fatty acid concentrations of rats subjected to***
289 ***each diet.***

290

| Diet group | Diet description | Diet | | Serum | | N = |
|------------|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-----|
| | | C15:0 | C17:0 | C15:0 | C17:0 | |
| 1 | 70% corn oil | 0.007 | 0.073 | 0.047 | 0.113 | 6 |
| 2 | 50% corn oil / 20% MCT/beef | 0.050 | 0.090 | 0.066 | 0.159 | 8 |
| 3 | 35% corn oil / 35% MCT/beef | 0.084 | 0.120 | 0.081 | 0.189 | 9 |
| 4 | 20% corn oil / 50% MCT/beef | 0.118 | 0.150 | 0.094 | 0.203 | 9 |
| 5 | 5% corn oil / 65% MCT/beef | 0.152 | 0.179 | 0.106 | 0.225 | 6 |

291

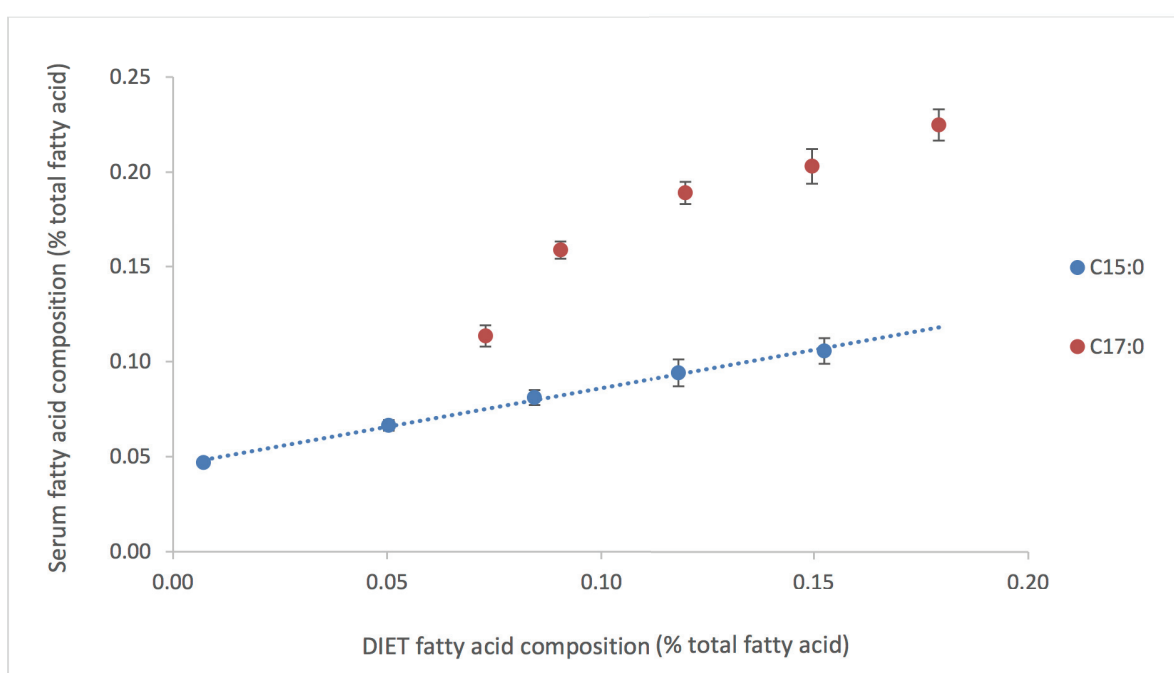
292

293 If these two OCS-FAs are biomarkers of ruminant fat they should have strong
294 positive correlation with dietary intake, this relationship has been investigated and is
295 illustrated on Figure 1. Interestingly, changes in OCS-FA C15:0 from the diet and
296 serum levels are highly linearly correlated, although C17:0 levels increased with
297 dietary intake, there is no direct linear correlation observed between the serum
298 concentration and dietary intake levels of this fatty acid.

299

300 **Figure.1. Comparison between the diet composition and the serum**
301 **composition of C15:0 and C17:0. C15:0 trendline equation is; $y = 0.4064x +$**
302 **0.0453 , with $R^2 = 0.9966$. Error bars represent \pm standard error of the mean.**

303



304

305

As shown in the figure above the relationship between dietary intake and serum composition of C15:0 is linear, however, there is not a truly linear relationship for C17:0. This divergence between these OCS-FAs is supported in published literature [4] [3] [31].

306

307

308 **5.1 DISCUSSION**

309

310 There has been a significant number of epidemiological studies that showed an
311 association between ruminant fat consumption and odd chain fatty acids levels,
312 suggesting that the odd chain saturated fatty acids (pentadecanoic and heptadecanoic
313 acids) are intake markers of ruminant fat but there are also studies that have failed to
314 show such associations. However, dietary intake data are obtained from food diaries
315 and retrospective questionnaires which are used to calculate the prevalence of these
316 fatty acids within the diet, and then compared with the fatty acid concentrations within
317 the tissue samples of the participants. It is reasonable to assume that a certain degree
318 of bias is introduced based on the self-reporting food diaries [32] [33] [34]. These
319 conclusions could be further biased on the assumption that odd chain fatty acids are
320 not endogenously produced and that their single source is from the food categories
321 listed within the diet questionnaires. Based on a number of recent observations
322 however, new hypotheses have emerged that suggests there may also be a non-
323 dietary origin of OCS-FAs. Firstly, it has been noted that dietary intake ratios compared
324 to tissue ratios between pentadecanoic acid and heptadecanoic acid are inconsistent
325 [1] [2] [3] suggesting that there are alternative sources for these fatty acids. Secondly,
326 an α -oxidation metabolic pathway has been suggested to produce OCS-FAs from even
327 chain fatty acids [9] [35] [36]. In fact, fatty acid breakdown through α -oxidation has
328 been described previously as a potential metabolic pathway with regards to changes
329 observed in adipocyte fatty acid composition during cell differentiation [37] [38].

330 Through an overfeeding intervention the participants in this study were
331 prescribed to consume significantly larger quantities of dairy fat for 56 days,
332 representing around a 1.5 fold increase in their normal ruminant fat intake. Therefore,
333 a significant increase of any marker of ruminant fat intake was expected. Our results
334 showed that pentadecanoic acid, (see Table.3.) significantly increased ($P=0.031$) from
335 the intervention, whereas there was no significant difference in heptadecanoic acid
336 during the feeding intervention ($P=0.951$). This divergence between C15:0 and C17:0
337 levels shows that these fatty acids behave rather differently from each other *in vivo*.
338 This suggests that only C15:0 is a linear biomarker for ruminant fat intake and therefore
339 C17:0 levels are influenced by other processes such as intestinal absorption or
340 endogenous synthesis or metabolism.

341 Since circulating C15:0 levels increased proportionally with those in the diet, it
342 is reasonable to assume that there must be another mechanism involved besides
343 direct dietary intake for C17:0 *in vivo*. This theory is not challenged by the dietary
344 assessment results (see Table.4.), which confirmed that the participants had a
345 significant increase in their calculated ruminant fat intake. If all OCS-FAs are true
346 biomarkers of ruminant fat then the circulating OCS-FA levels should have reflected
347 this dietary increase.

348 In order to further test this divergence in the metabolism of C15:0 and C17:0,
349 we conducted an animal study where five groups of rats were subjected to separate
350 isocaloric high-fat diets. Each diet had an increasing level of ruminant fat (see
351 Table.1.) which in turn results in an increase in levels of OCS-FAs (see Table.5.). To
352 further assess the validity of OCS-FAs as ruminant fat intake biomarkers, the dietary
353 intake with the serum level of these fatty acids were compared (see Figure.1.). OCS-
354 FA C15:0 showed a strong, positive linear relationship between the increased dietary

355 fat concentration and the serum levels ($y = 0.4064x + 0.0453$, $R^2 = 0.9966$). However,
356 C17:0 did not show a linear relationship between dietary and serum concentrations
357 (see Figure.1.) although there was a general positive trend in C17:0 plasma
358 concentrations as the dietary concentrations increased. This increase likely explains
359 the categorisation of C17:0 as a dietary biomarker, however, this relationship is clearly
360 not linear, suggesting the involvement of an alternative metabolic pathway acting on
361 this OCS-FA. Evidence for this metabolic pathway is further supported by data from
362 the second rat diet group, where the serum C17:0 is drastically higher compared to
363 group one, 40% fold increase ($P = 3.60E-05$), even though the diet composition of
364 C17:0 had a marginal increase only, 24% fold. This suggests that other factors are
365 driving the levels of C17:0.

366 In conclusion, the results disprove our original hypothesis that all OCS-FAs
367 (pentadecanoic and heptadecanoic acids) are true intake markers of ruminant fat. This
368 evidence should stimulate further research into the true origin of the different odd chain
369 fatty acid species in human metabolism, as clearly, they are not all exclusively derived
370 from ruminant sources but are likely involved in alternative endogenous metabolic
371 pathways either in their production or metabolism. The discrepancies between these
372 OCS-FAs also correlate with their relationship to disease risk [39] [40] [2] which
373 requires further investigation.

374

375

376 **ACKNOWLEDGMENTS**

377

378 The authors are grateful to the Medical Research Council Human Nutrition
379 Research in Cambridge, as this is the location for the project described in this

380 manuscript and for the MRC's financial support (Lipid Profiling and Signalling
381 programme grant; number UD99999906 and by Cambridge Lipidomics Biomarker
382 Research Initiative; grant G0800783). Additionally, the authors would like to
383 acknowledge the USDA (ACNC-USDA-CRIS 6251-51000-005-03S) for funding of the
384 animal study within this manuscript.

385 Benjamin Jenkins designed and conducted the research, analysed samples &
386 data and wrote & designed the paper. Kévin Seyssel provided essential materials and
387 wrote the paper. Zsuzsanna Ament wrote the paper. Keith Summerhill was
388 responsible for some preliminary work. Maud Alligier designed the original protocol
389 for the human study. Martine Laville designed the original research proposal for the
390 human study with Maud Alligier. Martin Ronis designed, conducted and lead the
391 animal study, provided essential materials and wrote the paper. Albert Koulman
392 designed the research study, wrote the paper and is the PhD supervisor of Benjamin
393 Jenkins.

394 "The authors declare no conflict of interest".

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

REFERENCES

[1] Khaw K-T, Friesen MD, Riboli E, Luben R, Wareham N. Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: the EPIC-Norfolk prospective study. *PLoS Med*. 2012;9(7):e1001255.

[2] Forouhi NG, Koulman A, Sharp SJ, Imamura F, Kröger J, Schulze MB, et al. Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* [Internet]. 2014 Aug [cited 2014 Sep 12]; Available from: [http://www.thelancet.com/journals/landia/article/PIIS2213-8587\(14\)70146-9/abstract](http://www.thelancet.com/journals/landia/article/PIIS2213-8587(14)70146-9/abstract)

[3] Brevik A, Veierød MB, Drevon CA, Andersen LF. Evaluation of the odd fatty acids 15:0 and 17:0 in serum and adipose tissue as markers of intake of milk and dairy fat. *Eur J Clin Nutr*. 2005 Aug 24;59(12):1417–22.

[4] Djoussé L. Is Plasma Pentadecanoic Acid a Reasonable Biomarker of Dairy Consumption? *J Am Heart Assoc*. 2013 Aug 23;2(4):e000393.

[5] Smedman AE, Gustafsson I-B, Berglund LG, Vessby BO. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *Am J Clin Nutr*. 1999 Jan 1;69(1):22–9.

[6] Sofie Biong A, Berstad P, Pedersen JI. Biomarkers for intake of dairy fat and dairy products. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2006;108(10):827–34.

[7] Wolk A, Furuheim M, Vessby B. Fatty Acid Composition of Adipose Tissue and Serum Lipids Are Valid Biological Markers Of Dairy Fat Intake in Men. *J Nutr*. 2001 Mar 1;131(3):828–33.

- [8] WFC. Whole Food Catalog [Internet]. whole food catalogue. 2014 [cited 2014 Mar 6]. Available from: <http://wholefoodcatalog.info/>
- [9] Jenkins B, West JA, Koulman A. A Review of Odd-Chain Fatty Acid Metabolism and the Role of Pentadecanoic Acid (C15:0) and Heptadecanoic Acid (C17:0) in Health and Disease. *Molecules*. 2015 Jan 30;20(2):2425–44.
- [10] Skeaff CM, Hodson L, McKenzie JE. Dietary-Induced Changes in Fatty Acid Composition of Human Plasma, Platelet, and Erythrocyte Lipids Follow a Similar Time Course. *J Nutr*. 2006 Mar 1;136(3):565–9.
- [11] Sobrecases H, Lê K-A, Bortolotti M, Schneiter P, Ith M, Kreis R, et al. Effects of short-term overfeeding with fructose, fat and fructose plus fat on plasma and hepatic lipids in healthy men. *Diabetes & Metabolism*. 2010 Jun;36(3):244–6.
- [12] Mensink RP, Katan MB. Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1992 Aug 1;12(8):911–9.
- [13] Alligier M, Meugnier E, Debard C, Lambert-Porcheron S, Chanseaume E, Sothier M, et al. Subcutaneous Adipose Tissue Remodeling during the Initial Phase of Weight Gain Induced by Overfeeding in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2012 Feb;97(2):E183–92.
- [14] Wolk A, Vessby B, Ljung H, Barrefors P. Evaluation of a biological marker of dairy fat intake. *Am J Clin Nutr*. 1998 Aug 1;68(2):291–5.
- [15] Rosell M, Johansson G, Berglund L, Vessby B, de Faire U, Hellénus M-L. Associations between the intake of dairy fat and calcium and abdominal obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004 Aug 24;28(11):1427–34.
- [16] Alligier M, Gabert L, Meugnier E, Lambert-Porcheron S, Chanseaume E, Pilleul F, et al. Visceral Fat Accumulation During Lipid Overfeeding Is Related to

Subcutaneous Adipose Tissue Characteristics in Healthy Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2013 Jan 2;98(2):802–10.

[17] Seyssel K, Alligier M, Meugnier E, Chanseume E, Loizon E, Canto C, et al. Regulation of Energy Metabolism and Mitochondrial Function in Skeletal Muscle During Lipid Overfeeding in Healthy Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2014 Mar 31;99(7):E1254–62.

[18] Ronis MJJ, Baumgardner JN, Sharma N, Vantrease J, Ferguson M, Tong Y, et al. Medium chain triglycerides dose-dependently prevent liver pathology in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Feb 1;238(2):151–62.

[19] Ronis MJJ, Korourian S, Zipperman M, Hakkak R, Badger TM. Dietary Saturated Fat Reduces Alcoholic Hepatotoxicity in Rats by Altering Fatty Acid Metabolism and Membrane Composition. *J Nutr*. 2004 Apr 1;134(4):904–12.

[20] Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497–509.

[21] Ament Z, Waterman CL, West JA, Waterfield C, Currie RA, Wright J, et al. A metabolomics investigation of non genotoxic carcinogenicity in the rat. *J Proteome Res*. 2013 Dec 6;12(12):5775–90.

[22] De Oliveira Otto MC, Nettleton JA, Lemaitre RN, M. Steffen L, Kromhout D, Rich SS, et al. Biomarkers of Dairy Fatty Acids and Risk of Cardiovascular Disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Heart Assoc [Internet]*. 2013 Aug 23 [cited 2014 Jan 27];2(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3828802/>

[23] Mozaffarian D, Cao H, King IB, Lemaitre RN, Song X, Siscovick DS, et al. Trans-Palmitoleic Acid, Metabolic Risk Factors, and New-Onset Diabetes in U.S. Adults: A Cohort Study. *Ann Intern Med*. 2010 Dec 21;153(12):790–9.

[24] Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Progress in Lipid Research*. 2008 Sep;47(5):348–80.

[25] Aro A, Jauhiainen M, Partanen R, Salminen I, Mutanen M. Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*. 1997 May 1;65(5):1419–26.

[26] Sluijs I, Forouhi NG, Beulens JW, Schouw YT van der, Agnoli C, Arriola L, et al. The amount and type of dairy product intake and incident type 2 diabetes: results from the EPIC-InterAct Study. *Am J Clin Nutr*. 2012 Aug 1;96(2):382–90.

[27] Mozaffarian D. Saturated fatty acids and type 2 diabetes: more evidence to re-invent dietary guidelines. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2014 Oct;2(10):770–2.

[28] Getachew G, DePeters EJ, Robinson PH, Taylor SJ. In vitro rumen fermentation and gas production: influence of yellow grease, tallow, corn oil and their potassium soaps. *Animal Feed Science and Technology*. 2001 Sep 17;93(1–2):1–15.

[29] Zlatanić A, Lava C, Zhang W, Petrović ZS. Effect of structure on properties of polyols and polyurethanes based on different vegetable oils. *J Polym Sci B Polym Phys*. 2004 Mar 1;42(5):809–19.

[30] Mondello L, Casilli A, Tranchida PQ, Costa R, Chiofalo B, Dugo P, et al. Evaluation of fast gas chromatography and gas chromatography–mass spectrometry in the analysis of lipids. *Journal of Chromatography A*. 2004 May 7;1035(2):237–47.

[31] Arab L. Biomarkers of Fat and Fatty Acid Intake. *J Nutr.* 2003 Mar 1;133(3):925S – 932S.

[32] KRISTAL AR, ANDRILLA CHA, KOEPESELL TD, DIEHR PH, CHEADLE A. Dietary Assessment Instruments are Susceptible to Intervention-associated Response Set Bias. *Journal of the American Dietetic Association.* 1998 Jan;98(1):40–3.

[33] Kipnis V, Midthune D, Freedman L, Bingham S, Day NE, Riboli E, et al. Bias in dietary-report instruments and its implications for nutritional epidemiology. *Public Health Nutrition.* 2002 Dec;5(6a):915–23.

[34] Vitolins MZ, Rand CS, Rapp SR, Ribisl PM, Sevick MA. Measuring Adherence to Behavioral and Medical Interventions. *Controlled Clinical Trials.* 2000 Oct;21(5, Supplement 1):S188–94.

[35] Takahashi T, Takahashi H, Takeda H, Shichiri M. Alpha-oxidation of fatty acids in fasted or diabetic rats. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 1992 May;16(2):103–8.

[36] Croes K, Foulon V, Casteels M, Veldhoven PPV, Mannaerts GP. Phytanoyl-CoA hydroxylase: recognition of 3-methyl-branched acyl-CoAs and requirement for GTP or ATP and Mg²⁺ in addition to its known hydroxylation cofactors. *J Lipid Res.* 2000 Apr 1;41(4):629–36.

[37] Su X, Han X, Yang J, Mancuso DJ, Chen J, Bickel PE, et al. Sequential Ordered Fatty Acid α Oxidation and $\Delta 9$ Desaturation Are Major Determinants of Lipid Storage and Utilization in Differentiating Adipocytes†. *Biochemistry.* 2004 May 1;43(17):5033–44.

[38] Roberts LD, Virtue S, Vidal-Puig A, Nicholls AW, Griffin JL. Metabolic phenotyping of a model of adipocyte differentiation. *Physiol Genomics*. 2009 Oct 1;39(2):109–19.

[39] Kratz M, Baars T, Guyenet S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *Eur J Nutr*. 2013 Feb 1;52(1):1–24.

[40] Fonteh AN, Cipolla M, Chiang J, Arakaki X, Harrington MG. Human Cerebrospinal Fluid Fatty Acid Levels Differ between Supernatant Fluid and Brain-Derived Nanoparticle Fractions, and Are Altered in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*. 2014 Jun 23;9(6):e100519.

ANNEXES AUTRES ARTICLES:

Annexe 9: An isocaloric increase of eating episodes in the morning contributes to decrease energy intake at lunch in men

Physiology & Behavior 110–111 (2013) 169–178



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phb



An isocaloric increase of eating episodes in the morning contributes to decrease energy intake at lunch in lean men

Xavier Allirot^{a,b,c,*}, Laure Saulais^{a,c}, Kevin Seyssel^{b,c}, Julia Graeppi-Dulac^{b,c}, Hubert Roth^{b,d}, Anne Charrié^{b,c,e}, Jocelyne Drai^{b,c,e}, Joelle Goudable^{b,c,e}, Emilie Blond^{b,c,e}, Emmanuel Disse^{b,c}, Martine Laville^{b,c}

^a Centre de Recherche de l'Institut Paul Bocuse, Château du Vivier, 69130 Ecully, France

^b Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre Hospitalier Lyon Sud, 69310 Pierre Bénite, France

^c Centre Européen de Nutrition pour la Santé, Lyon, France

^d Pôle Recherche, CHU Grenoble, Inserm U1055-Bioénergétique, Université J. Fourier, Grenoble, France

^e Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud-Charles Mérieux, Laboratoire de Biochimie du Centre Hospitalier Lyon Sud, 69495 Pierre-Bénite, CarMeN-INSERM U1060-Université Claude Bernard Lyon 1, France

HIGHLIGHTS

- ▶ An isocaloric spread out breakfast induced a decrease in appetite before lunch.
- ▶ Increasing eating episodes in the morning led to a decreased fat intake at lunch.
- ▶ Ghrelin concentration before lunch was decreased after a spread out breakfast.
- ▶ A spread out breakfast reduced lipolysis and diet-induced thermogenesis.
- ▶ The results led to potentially opposite implications of the meal spacing for health.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 September 2012

Received in revised form 3 December 2012

Accepted 10 January 2013

Keywords:

Eating frequency

Appetite control

Satiety

Ghrelin

Food intake

Glucagon-like peptide-1

ABSTRACT

The effects of increasing eating frequency on human health are unclear. This study used an integrated approach to assess the short-term consequences on appetite and metabolism. Twenty normal-weight men participated in: (i) two sessions consisting of a breakfast consumed in one eating episode at T0 (F1), or in four isocaloric eating episodes at T0, T60, T120, and T180 min (F4), and followed by an ecological ad libitum buffet meal (T240) designed in an experimental restaurant. Intakes were assessed for the whole buffet meal and for each temporal quarter of the meal. (ii) two sessions consisting of the same two breakfasts F1 and F4 in a Clinical Investigation Centre. Blood sampling was performed to study the kinetics of ghrelin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), glucose, insulin, triglycerides and non-esterified fatty acids (NEFA). Substrate oxidation was measured by indirect calorimetry. During each of the 4 sessions, participants rated their appetite throughout the experiment. After F4, at T240 min, GLP-1 concentration was higher ($P=0.006$) while ghrelin concentration and hunger ratings were lower ($P<0.001$). We showed a trend for subjects to consume less energy (-88 ± 61 kcal, $P=0.08$) at the buffet after F4, explained by a decrease in lipid intake ($P=0.04$). Marked differences in consumption were observed during the last temporal quarter of the meal for total energy and lipid intake ($P=0.03$). Mixed models highlighted differences between F1 and F4 for the kinetics of glucose, insulin and NEFA ($P<0.001$). The area under the curve was lower for insulin ($P<0.001$) and NEFA in F4 ($P=0.03$). Diet induced thermogenesis was reduced in F4 ($P<0.05$). This study demonstrated the beneficial short-term effect of increasing eating frequency on appetite in lean men considering subjective, physiological and behavioral data. However, the loss of the inter-prandial fast was associated with an inhibition of lipolysis, reflected by NEFA profiles, and a decrease in energy expenditure.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Overweight and obesity are explained by an imbalance between energy intake and energy expenditure [1]. Many genetic, environmental, cultural, socioeconomic and behavioral factors may influence energy intake. Among behavioral factors, the number of eating episodes we have in a day is a fundamental aspect of our dietary habits

* Corresponding author at: Centre de Recherche de l'Institut Paul Bocuse, Château du Vivier, 69130 Ecully, France. Tel.: +33 472 18 54 66; fax: +33 472 18 54 69.
E-mail address: xavier.allirot@institutpaulbocuse.com (X. Allirot).

but there is no scientific consensus as to the optimum number of meals we should have for weight management and speculations regarding this are often contradictory [2]. Nevertheless, the consumption of small and frequent meals is often advised despite the lack of clear scientific evidence to justify it [3].

Fabry et al. [4] were the first to demonstrate an inverse relationship between meal frequency and body weight in humans. However, this relationship shown in other epidemiological studies [5–7] is likely to be an artifact produced by underreporting of eating frequency concurrent with underreporting of energy intake [8,9]. When implausible energy intake reporting is taken into account, the association between eating frequency and body weight is even found to be positive in some studies [10]. Because of these methodological issues, the epidemiological evidence about the relationship between eating frequency and health appears to be very weak.

Experimental studies may help to better understand the effect of eating frequency on health and particularly body weight, via the assessment of metabolic and appetite (mainly hunger and satiety) parameters. It has been shown for example that irregular eating frequency could lead to a decrease in diet induced thermogenesis (DIT) [11], an increase in the release of insulin [12] and an increase in energy intake [13]. The effect of adding a snack between meals has also been explored experimentally and has been shown to have poor satiating effect if consumed in a nonhungry state [14,15]. Eating frequency can easily be experimentally manipulated, but habitual eating frequency of subjects has also to be taken into account, as differences in energy compensation and intake regulation [16,17] or metabolic responses [18] have been observed between habitual nibblers and habitual gorgers. Moreover, hunger and satiety are psycho-physiological constructs, making them complex phenomena to study and measure [19]. They can be measured directly via a behavioral assessment (food intake), indirectly via ratings of subjective sensations, or through the measurement of biomarkers of satiation and satiety [20], such as ghrelin which appears to act as a meal initiator [21] or glucagon-like peptide-1 (GLP-1) which is likely to be a causal factor in the process of satiation [22].

To date, experimental studies assessing the short-term consequences of an isocaloric increase of eating frequency have only partially considered these parameters. These studies led to conflicting results regarding the effect of frequent eating on subjective appetite and subsequent ad libitum meals [23–26], on appetite hormones [27,28] and on metabolic consequences such as diet induced thermogenesis (DIT) or substrate oxidation [29–31].

Considering the above, it appears necessary to conduct more studies in order to clarify the effect of increasing eating frequency on energy balance, taking into consideration multiple approaches: appetite exploration with subjective data, behavioral assessment and physiological approach (ghrelin and GLP-1) and investigation of metabolic parameters and substrate oxidation. One issue of such an integrated approach is that the implementation of physiological measurements implies that the experiments have to be carried out in a hospital-based laboratory, which may generate contextual or emotional biases to the behavioral measurements. In such a context, it is difficult to reproduce an ecological eating situation. Such designs may thus be incompatible with the realization of accurate behavioral measurements [32]. Indeed, it has already been shown that it is highly important to take care of context and environment when studying eating behaviors and food intake [33,34].

The interest in satiety research of an integrated approach was demonstrated in a previous paper [32]. The present study was based on this proposal to combine an in-depth behavioral approach to physiological measurements in two specific and adequate places. The objective was to assess the short-term consequences of an isocaloric increase of eating frequency:

- on appetite, through the assessment of:
 - subjective (Visual Analog Scales) and physiological (ghrelin and GLP-1) data before the subsequent meal,

- food intake and behavioral data during the subsequent meal designed in a normal-eating context,
- on metabolism, through the assessment of metabolic kinetics, substrate oxidation and diet induced thermogenesis.

2. Material and methods

2.1. Subjects

Twenty healthy normal-weight men with a mean age of 27.1 ± 1.3 years (mean \pm SEM) and a mean body mass index (BMI) of 22.0 ± 0.3 kg/m² were recruited through advertisements. Subjects were eligible for the study if they were considered healthy at the medical examination. They should have normal fasting plasma glucose (<7 mmol/l), cholesterol (≤ 6.8 mmol/l) and triglycerides (≤ 2.5 mmol/l) concentrations. All subjects reported moderate levels of physical activity (less than 4 h of sport per week), and were non-smokers. They were all habitual 3 or 4 meals eaters and were used to eating at breakfast and lunchtime. None of them were night workers. None of the subjects had food allergies. To be eligible, subjects had to declare liking at least 75% of the test food items given during the study and to not dislike any of them. Before being included, all subjects were asked to fill in a validated French translation of the Dutch Eating Behavior Questionnaire [35,36] and of the Three Eating Factor Questionnaire [37,38] and should present normal scores.

All subjects gave their written consent to participate in the study. The study was approved by the Scientific Ethics Committee of Lyon Sud Est II and AFSSAPS (French health products safety agency) and complied with both the French Huriet-Serusclet law and the Second Declaration of Helsinki. The study was registered at Clinical Trials (registration number: NCT01573988).

2.2. Study design

The study was conducted following a randomized crossover design from September 2010 to May 2011. Explorations were conducted at the Rhône-Alpes Research Centre for Human Nutrition (CRNH) and at the Institut Paul Bocuse Research Centre (IPB).

After being included, subjects had a first visit to the experimental restaurant of IPB [39] for lunch. The aim of this first visit was to familiarize subjects with the environment and foods used during the study. During this visit, subjects were invited to the experimental restaurant at 12:00 and were asked to taste all of the food items offered, during an individual buffet-type meal. A choice of classical hot and cold French food items with varied macronutrient compositions was offered: grated carrots, “pâté de campagne”, rice, French beans, fried potatoes, sausages, chicken breast, cottage cheese, cheese (“Comté”), stewed fruit, chocolate cake, white bread and sugar. The energy content and macronutrient composition of these food items are described in a previous validation study [40]. Subjects were instructed to eat ad libitum. Their liking for each food item was also recorded in order to verify the acceptability of all food items. Subjects had to rate their liking of each food item on a 100 mm electronic visual analog scale (VAS). The mean rating of food items varied from 5.6 ± 0.1 (for grated carrots), to 7.5 ± 0.1 (for cottage cheese).

After this first visit, subjects were invited to four other experimental sessions, each separated by at least 7 days: two of these sessions were conducted in IPB for behavioral explorations, while the two others took place in CRNH for metabolic explorations. The interest of duplicating the same protocol in two sites, one specialized in clinical nutrition (CRNH), the other equipped for studying with precision eating behaviors during a meal (IPB), was described in a previous paper [32].

The order of these four sessions was randomized across the participants to prevent any order effect. Subjects were requested to avoid vigorous activities and to abstain from alcohol consumption the day before each session. Subjects were also asked to select a dinner they consume regularly and to eat this same meal the evening before each session.

For the four sessions, subjects were invited to report at 7:00 am. Either in CRNH or in IPB, they were instructed to be in a fasted state since the evening before (9:00 pm). They were given each time the same 674.8 kcal breakfast, either in one – 20 min long – eating episode at T0 (8:00 am) (F1 condition) or in four – 10 min long – 168.7 kcal identical spaced presentations provided every hour at T0, T60, T120 and T180 min (F4 condition) (Table 1). Subjects were asked to eat all the food given for breakfast. Thus, total energy intake for breakfast was the same in the two conditions F1 and F4. Each of the subjects received the breakfast in one eating episode (F1) on two occasions: once in IPB for behavioral exploration, once in CRNH for metabolic exploration. They received the breakfast in four spaced presentations (F4) on two occasions: once in IPB for behavioral exploration, once in CRNH for metabolic exploration.

2.3. Appetite profiles

Electronic visual analog scales (VAS) were used to assess feelings of hunger, satiety, prospective food consumption and desire to eat savory, sweet food and food rich in energy. VAS were completed both in IPB and CRNH at T0, T20, T80, T140, T200, and T240 min. Each electronic VAS consisted of a 70 mm line [41], presented on Dell Netbook (Latitude 2100 model, Dell Inc., Round Rock, TX, USA) anchored at the beginning and end by opposing statements such as: “not hungry at all” and “extremely hungry”, in response to the question: “how hungry do you feel?”. Subjects were requested to click on the line that best matched how they were feeling at the time. FIZZ Sensory Software 2.40 H by Biosystèmes (Couternon, France) was used for automatic data capture and transforming results in a 0 to 10 score.

2.4. Behavioral explorations (IPB)

Subjects came twice to IPB in groups of five subjects for behavioral explorations. From 7:00 am to the end of the experiment, they were free to practice the sedentary activity of their choice such as reading books or magazines, watching movies, listening to music or working on a computer.

For lunch at T240 min (12:00), subjects were offered exactly the same eating situation each time, identical to the first familiarization visit and for which a detailed description is available elsewhere [32]. A “brasserie” ambiance was created in the experimental restaurant, using brasserie furniture and background music, to construct a pleasant environment for eating. Five individual spaces for service (buffet) and consumption were created, using decorative folding screens, where subjects were invited to eat without communicating with others. Subjects ate, seated in front of a small table. Each buffet meal was individual and located close to each subject's table. Each food item previously tasted in the first visit was offered and available in larger quantities than the expected intake for an average subject. All food items were cut into small pieces, to avoid suggesting an appropriate amount to eat. Subjects were invited to eat as long as they wanted, until comfortably full. They could get up

and help themselves to any food item in any quantity freely during the meal. Chafing dishes, commonly used for French buffets, were used in order to keep hot food items at constant temperature throughout the meal.

It was demonstrated in a previous study that this tool was valid for assessing the effects of interventions on food intake. Good reproducibility was found between two identical sessions for total energy and macronutrient intake for the whole meal and for each temporal quarter of the meal. These parameters were also found to be sensitive to differences in hunger level induced by a period of food deprivation [40].

Video recordings during the buffet meal and weighing of food before and after the meal enabled us to collect behavioral data such as: meal duration, mean energy density of the meal, energy, carbohydrate, lipid and protein intake for the whole meal. Total energy intake has been expressed in kcal and in % of the individual daily energy requirement (DER) of the subjects, based upon their basal metabolic rate measured in the CRNH (mean of F1 and F4 condition) multiplied by a 1.375 coefficient which corresponds to a moderate physical activity level. The determination of the content of each bite also enabled us to estimate the energy intake for each minute of each meal of the subjects and to determine energy intakes for each temporal quarter of the meal.

2.5. Metabolic explorations (CRNH)

Each subject came twice to CRNH for metabolic explorations. When the subjects arrived, an i.v. catheter was inserted into the antecubital vein for blood sampling for measurement of plasma ghrelin, glucose-like peptide-1 (GLP-1), glucose, insulin, non-esterified fatty acid (NEFA) and triglycerides (TG) concentrations. Subjects stayed in a bed during all the experiment as continuous indirect calorimetry measurements were performed but they were not allowed to sleep. In the interval between consecutive measurements, subjects were allowed to read, watch movies, listen to music or work on a computer. Venous blood sampling was collected into serum or EDTA tubes 17 times (T0, 10, 20, 40, 60, 70, 80, 100, 120, 130, 140, 160, 180, 190, 200, 220, and 240 min). TG and NEFA concentrations were only measured 10 times at (T0, 10, 20, 40, 60, 100, 140, 180, 220, and 240 min). For TG, NEFA, glucose and insulin analysis, blood samples were collected into serum tubes. For acylated ghrelin, blood samples were collected in tubes containing EDTA; para-hydroxymercuribenzoic acid in HCl (1 mM in the final sample volume) was immediately added to plasma to prevent degradation of acylated ghrelin by protease. Vacutainer EDTA-plasma tubes with dipeptidyl peptidase IV inhibitor were used for GLP-1 collection. After collection, all blood samples were centrifuged for 10 min at 4 °C at 4500 rpm. Plasma samples were immediately stored at –23 °C until analysis. For each metabolic exploration day, a total of 115 ml of blood was sampled.

Plasma glucose concentrations were measured using an enzymatic method (Hexokinase) and TG concentrations were determined using spectrophotometric methods, both on a AU2700 Beckman Coulter® (O'Callaghan's Mills Ireland), NEFA concentrations were determined via an enzymatic method (Wako® Chemicals GmbH Neuss, Deutschland). We measured acylated plasma ghrelin concentration by enzyme immunoassay kits (ELISA) using a Bertin Pharma SPI-Bio kit (Montigny-le-Bretonneux, France). Insulin concentrations were determined using an immunoreactive method with Bi-Ins-IRMA kit (Cisbio Bioassays, IBA, Gif/Yvette, France).

Total GLP-1 concentrations were determined with EDI™ total GLP-1 ELISA kit (Epitope Diagnostics Inc., San Diego, CA92126 USA) distributed by Labodia S.A. (Paris, France).

Indirect calorimetry measurements were performed during the basal period (T-30 to T0), and from T0 to T240 min. We used the DELTATRAC II™ calorimeter (Datex instrumentary corporation, Helsinki, Finland) and the QUARK RMR (Cosmed, Rome, Italy). Data obtained from these two calorimeters have shown equivalency [42]. From T-30 to T240 min,

Table 1

Nutritional composition of the 674.8 kcal breakfast in F1 condition. For each intake of the F4 condition, values should be divided by 4.

| | Quantity (g) | Carbohydrate (g) | Lipid (g) | Protein (g) | Total energy (kcal) |
|-----------------------|--------------|------------------|-----------|-------------|---------------------|
| White bread | 40 | 23.0 | 0.6 | 3.3 | 110.6 |
| Croissant | 80 | 35.35 | 18.7 | 5.5 | 331.7 |
| strawberry jam | 30 | 16.33 | 0.1 | 0.1 | 66.6 |
| Unsalted butter | 10 | 0.15 | 8.3 | 0.1 | 74.8 |
| Orange juice | 120 | 10.75 | 0.2 | 0.8 | 48.0 |
| White sugar | 10 | 10.0 | 0 | 0 | 40.0 |
| Black coffee (or tea) | 400 | 0 | 0.08 | 0.6 | 3.1 |

oxygen consumption (VO_2 in l/min) and carbon dioxide production (VCO_2 in l/min) were recorded every minute for periods of 30 min over 4.5 h. Respiratory quotient (RQ) was assessed as the VCO_2/VO_2 ratio. The non-protein respiratory quotient (NPRQ) was calculated using the formula:

$$NPRQ = (VCO_2 - 0.774 \times P) / (VO_2 - 0.966 \times P)$$

where P is the protein oxidation in g/min: $P = 6.25 \times N$ and N is the urinary nitrogen excretion in g/min. Substrate oxidation (proteins, lipids and carbohydrates), resting metabolism rate (RMR) and energy expenditure (EE) were calculated with Ferrannini's equation [43]. Fat and carbohydrate balance were expressed as g eaten – g oxidized, using data from T0 to T240. All the results were obtained from the average of each 30 min period. Diet induced thermogenesis (DIT), i.e. the increment of EE above basal resting metabolic rate (RMR) was calculated with the formula:

$$\% \text{ DIT} = [\sum (\text{PPMR} - \text{RMR}) \times \text{Time}] / \text{ECM}$$

with PPMR: postprandial metabolic rate in kcal/min, RMR: resting metabolic rate in kcal/min, Time: time of measure (min), and ECM: energy content of meal in kcal.

In order to calculate protein oxidation, urine samples were collected twice during the day (T0, and T240), in order to measure urinary nitrogen content using a chemiluminescence method (Antek 7000, Alytek, Juvisy, France) [44].

2.6. Statistical analysis

The normality of each parameter was checked using Shapiro–Wilk test. To test for the differences between conditions F1 and F4, we used Student's paired *t*-test when the distribution of the variable was normal, and Wilcoxon paired test when the distribution of the variable was not normal. We tested the difference between the two conditions F1 and F4: for total energy and macronutrient intake during the whole meal and each temporal quarter of the meal, for all VAS parameters at T0 and at T240, for biological variables at T0 and at T240. We also tested, for biological variables, the difference between baseline and T240 for the same condition.

We used mixed models to compare kinetics of appetite scores. The dependent variable was the appetite score (hunger, satiety,...). The condition (F1 or F4), the place of measurement (IPB or CRNH), the time and the interaction time \times condition were considered as fixed effects. Subjects were considered as a random effect.

Similarly, mixed models were used to compare kinetics of biological variables. The dependent variable was the biological variable. The condition (F1 or F4), the time and the interaction time \times condition were considered as fixed effects. Subjects were considered as a random effect.

Total 240 min area under the curve (AUC) was calculated from the fasting (baseline) time point and the 16 postprandial time points for each biological variable. We further divided the testing day into two segments: from 0 to 120 min, and from 120 to 240 min and calculated individual AUC for each variable for these periods. For carbohydrate and lipid oxidation, incremental area under the curve (IAUC) was calculated. For all AUC and IAUC measurements, the trapezoidal rule was used [45].

A random effect regression model was used to assess the part of the variability (within subjects and between subjects) of ad libitum energy intake explained by hunger score measured prior to the buffet lunch (T240) (F1 and F4 data pooled). Simple regressions were used to assess the relationship between energy intake at lunch and GLP-1, ghrelin concentrations at T240.

All tests were two-sided and differences were considered significant at $P < 0.05$. Values are expressed as mean \pm standard error of mean (SEM). JMP® 9 statistical software (SAS Institute Inc., NC, USA) was used for all statistical analyses except for the random effect regression

model for which we used Stata Version 12 statistical software (Stata Corp, College Station, TX).

From a previous study led in our laboratory [46], we calculated that a minimum sample size of 19 subjects was necessary to observe a significant difference in ghrelin concentrations before lunch, after two different breakfasts (control vs. breakfast inducing a 40% decrease of glycemic excursion), with a significance level of 0.05 and a power of 80%. Furthermore, according to Speechly et al. [23], fourteen subjects were necessary to observe a significant difference in ad libitum energy intake at lunch after a breakfast in one vs. five eating opportunities, with a significance level of 0.05 and a power of 80%. We included 20 subjects.

3. Results

3.1. Appetite

3.1.1. Subjective appetite

VAS scores are shown in Fig. 1. No baseline difference (T0) was found between the two conditions F1 and F4 either in IPB or in CRNH, for all VAS scores. Over the whole 0–240 period, for all VAS parameters, there was an effect of time ($P < 0.0001$), an effect of the condition ($P < 0.001$) and a time \times condition interaction ($P < 0.0001$). There was an effect of the place of measurement (IPB vs. CRNH) for hunger scores ($P = 0.025$), desire to eat food rich in energy ($P = 0.044$) and desire to eat savory food ($P = 0.029$). Values for these three scores were mostly higher in IPB than in CRNH as shown in Fig. 1A, D and E.

At T240 (just before lunch), in F4 condition, subjects declared being less hungry (IPB: $P < 0.0001$; CRNH: $P = 0.002$), more satiated (IPB: $P < 0.0001$; CRNH: $P = 0.002$), prospective food consumption was lower (IPB: $P = 0.028$; CRNH: $P = 0.001$), desire to eat sweet food was lower (IPB: $P = 0.004$; CRNH: $P = 0.01$), desire to eat food rich in energy was lower in IPB ($P = 0.005$) but not in CRNH ($P = 0.06$). No differences between conditions were found at T240 for the desire to eat savory food.

When the data for F1 and F4 were pooled, we found that the level of hunger prior to the ad libitum buffet lunch explained 35.6% of the intra-individual variability for total energy intake at lunch (within subjects), while inter-individual variability (between subjects) was very weakly explained ($R^2 < 0.1$) (overall $P = 0.004$).

3.1.2. Behaviors during ad libitum buffet meal

No difference was found in meal duration ($23' 54'' \pm 0' 49''$ in F1 condition; $22' 45''$ in F4 condition, $P = 0.15$). Subjects consumed 88 ± 61 kcal less in F4 condition during the ad libitum buffet meal but this difference was not significant ($P = 0.08$) (Table 2). One of the subjects had a lower compliance compared to the others considering the respect of the instructions during the buffet meal. Energy intake results concerning this subject were found to be numerically distant from the rest of the sample (difference between energy intakes $F1 - F4 = -550$ kcal while the mean \pm SD for the 19 other subjects was 122 ± 219 kcal). When excluding this subject from the analysis, we found that the 19 subjects consumed a significantly smaller amount of food (716 ± 41.2 vs. 779.7 ± 45.5 g, $P = 0.01$) and less energy in F4 compared to F1 condition ($P = 0.02$). In F4 condition, the 20 subjects consumed less lipid ($P = 0.04$). No differences between conditions were found for carbohydrate, protein intake and for the mean energy density of the meal. The analysis by temporal quarter of the meal (Fig. 2) showed no difference in total energy, lipid, carbohydrate and protein intakes during the first three quarters. During the last temporal quarter of the meal, subjects consumed less energy in F4 condition ($P = 0.03$) and less energy from lipids ($P = 0.03$). For these parameters, the results were the same (with different *P*-values) with either 20 or 19 subjects.

3.1.3. Ghrelin

Acylated ghrelin concentrations are shown in Fig. 3A. Baseline ghrelin concentrations were not different between conditions. Over the whole 0–240 period, there was an effect of the condition ($P = 0.04$) and a

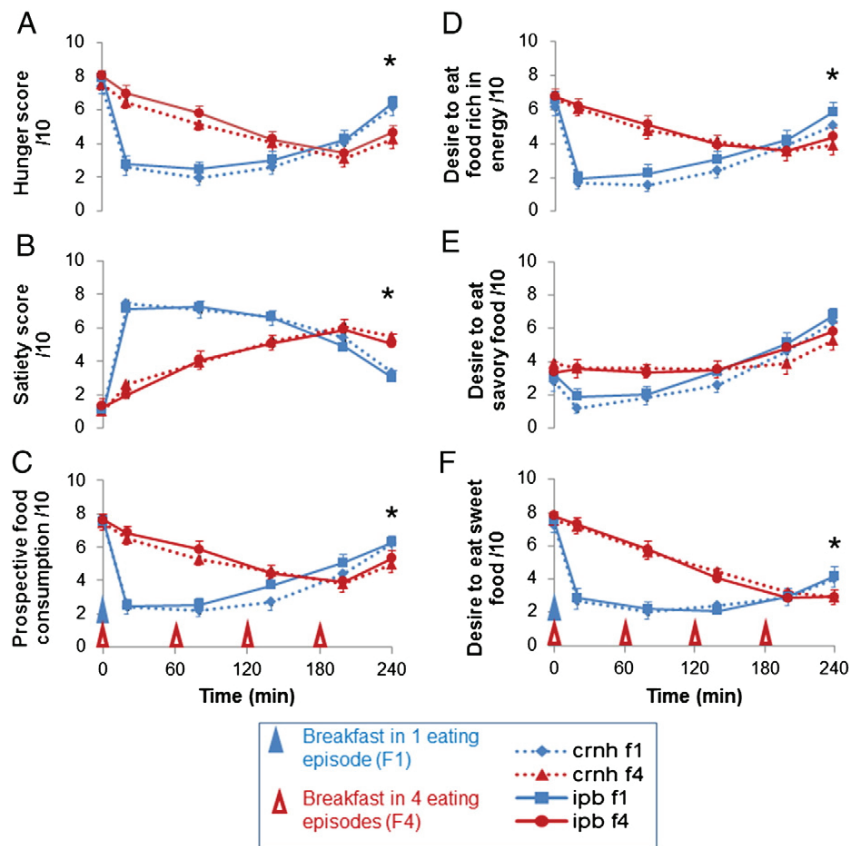


Fig. 1. Appetite scores between T0 and T240. Each value is a 0 to 10 score for hunger (A), satiety (B), prospective food consumption (C), desire to eat food rich in energy (D), savory food (E), and sweet food (F). Measurements have been done in the Research Centre in Human Nutrition Rhône-Alpes (CRNH) and the Institute Paul Bocuse Research Centre (IPB). * indicates that $P < 0.05$ where P values are results for the test comparing IPB F1 values vs. F4 at T240.

time \times condition interaction ($P < 0.0001$). Acylated ghrelin concentration was significantly lower at T240 in F4 condition: 57.94 ± 11.03 pg/ml vs. 91.81 ± 14.90 pg/ml in F1 ($P = 0.0003$). Ghrelin AUC for the 0–120 period was higher in condition F4 ($P = 0.0003$), while no difference was found for the 120–240 period and for the whole 0–240 period. No significant relationship was found between ghrelin concentrations at T240 and ad libitum energy intake at lunch.

3.1.4. GLP-1

GLP-1 concentrations are shown in Fig 3B. Baseline GLP-1 concentrations were not different between conditions. Over the whole 0–240 period, there was an effect of the condition ($P < 0.0001$) and a time \times condition interaction ($P < 0.0001$). GLP-1 concentration was

Table 2

Food intake during the ad libitum buffet lunch. Total energy intake (in kcal and expressed as % of individual daily energy requirement (DER)), amount of food eaten, energy density and macronutrient intakes (in kcal and % of energy intake) for conditions F1 and F4 (mean \pm SEM); P values are results for the test comparing means in F1 condition vs. F4.

| | F1 condition | F4 condition | P |
|--------------------------------|-----------------|-----------------|-------|
| Total energy intake (kcal) | 1355 \pm 69 | 1267 \pm 82 | 0.08 |
| Total energy intake (% of DER) | 59.2 \pm 12.5 | 55.2 \pm 14.2 | 0.13 |
| Amount of food eaten (g) | 785 \pm 43 | 742 \pm 47 | 0.08 |
| Energy density (kcal/g) | 1.75 \pm 0.05 | 1.72 \pm 0.06 | 0.65 |
| Carbohydrate intake (kcal) | 517 \pm 26 | 483 \pm 30 | 0.26 |
| Carbohydrate intake (%) | 38.4 \pm 1.0 | 38.3 \pm 1.0 | 0.87 |
| Lipid intake (kcal) | 614 \pm 36 | 567 \pm 43 | 0.04* |
| Lipid intake (%) | 45.1 \pm 0.8 | 44.5 \pm 1.1 | 0.47 |
| Protein intake (kcal) | 224 \pm 15 | 216 \pm 15 | 0.41 |
| Protein intake (%) | 16.5 \pm 0.7 | 17.2 \pm 0.7 | 0.25 |

* $P < 0.05$.

significantly higher at T240 in F4 condition: 2.79 ± 0.51 vs. 2.10 ± 0.37 pmol/l in F1 ($P = 0.0065$). GLP-1 AUC for the 0–120 period was lower in condition F4 ($P < 0.0001$), while no difference was found for the 120–240 period. AUC for the whole 0–240 period was significantly lower in condition F4 (692 ± 84 vs. 1014 ± 102 pmol.l⁻¹.min⁻¹, $P < 0.0001$). GLP-1 concentrations at T240 were related to ad libitum energy intake at lunch ($R^2 = 0.18$, $P = 0.02$).

3.2. Metabolism

3.2.1. Glucose

Baseline glucose concentrations were not different between conditions (Fig. 4A). Eating-relating oscillations in plasma glucose concentrations were observed following each eating episode. There was a significant effect of time ($P < 0.0001$) and an interaction time \times condition ($P < 0.0001$). In F4 condition, plasma glucose at T240 was higher than at baseline (5.9 ± 0.1 vs. 5.2 ± 0.1 , $P < 0.0001$) and was significantly higher compared to F1 condition (5.9 ± 0.1 vs. 5.01 ± 0.1 , $P < 0.0001$). Total AUCs were not statistically different between conditions but we observed a higher glucose AUC in F4 condition over the 120–240 period ($P = 0.01$).

3.2.2. Insulin

Baseline insulin concentrations were not different between conditions (Fig. 4B). Eating relating oscillations in plasma insulin concentrations were observed following each eating episode. There was a significant effect of time ($P < 0.0001$), an effect of the condition ($P = 0.0006$) and an interaction time \times condition ($P < 0.0001$). Similarly to plasma glucose, in F4 condition, plasma insulin concentration was at T240 higher than at baseline (13.9 ± 1.4 mIU/l vs. 3.0 ± 0.3 mIU/l, $P < 0.0001$) and was significantly higher compared to F1 condition (13.9 ± 1.4 mIU/l vs. $4.5 \pm$

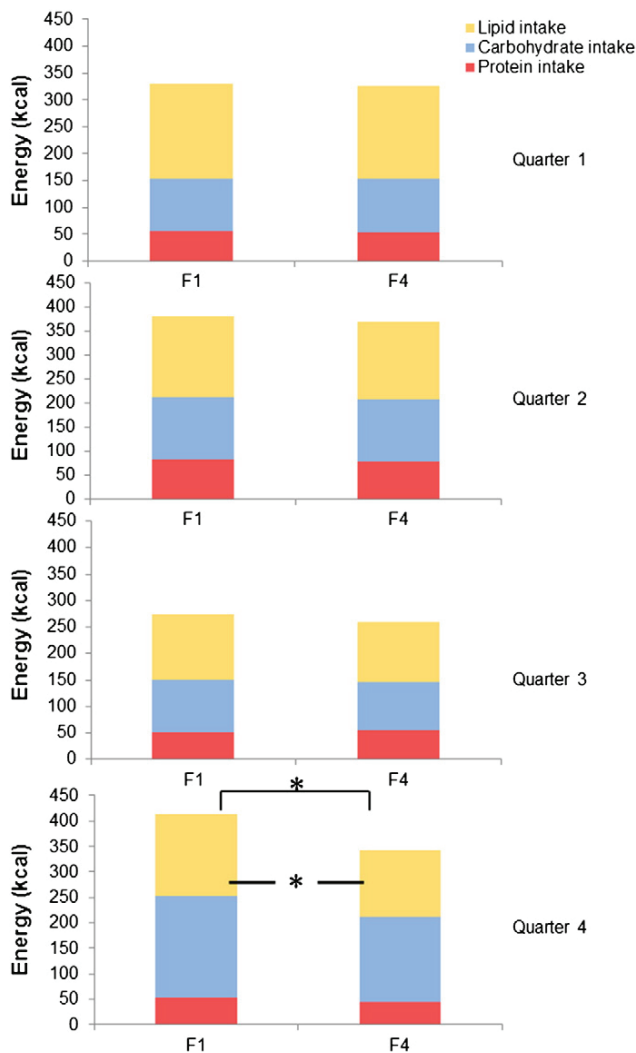


Fig. 2. Intakes for each temporal quarter of the ad libitum buffer meal. Mean lipid, carbohydrate and protein intake (kcal) are presented for each temporal quarter of the meal, for sessions F1 and F4. * indicates that $P < 0.05$ where P values are results for the test comparing between F1 and F4 total energy and each macronutrient intake.

0.8 mIU/l, $P < 0.0001$). Total insulin AUC was lower in F4 condition (3448 ± 238 vs. 4351 ± 363 mIU.l⁻¹.min⁻¹, $P = 0.0005$). Considering the two periods, insulin AUC in F4 condition was lower over the 0–120 period ($P < 0.0001$) and higher over the 120–240 period ($P = 0.004$).

3.2.3. Non-esterified fatty acids

Baseline NEFA concentrations were not different between conditions (Fig 4C). Eating-related decrease of plasma NEFA was observed in F1 and F4 conditions. But NEFA concentration in F4 condition stayed at a low level during all the morning and was at T240 lower compared to baseline (112.8 ± 8.3 $\mu\text{mol/l}$ vs. 328.9 ± 27.8 $\mu\text{mol/l}$, $P < 0.0001$) and to F1 condition (112.8 ± 8.3 $\mu\text{mol/l}$ vs. 294.9 ± 35.6 $\mu\text{mol/l}$, $P < 0.0001$). There was a significant effect of time ($P < 0.0001$), an effect of the condition ($P < 0.0001$) and an interaction time \times condition ($P < 0.0001$). Total NEFA AUC in F4 condition was statistically lower compared to F1 ($31,869 \pm 1686$ vs. $40,643 \pm 3126$ $\mu\text{mol.l}^{-1}$.min⁻¹, $P = 0.03$). No difference in NEFA AUC was observed over the 0–120 period while NEFA AUC was lower in F4 over the 120–240 period ($P = 0.001$).

3.2.4. Triglycerides

Baseline TG concentrations were not different between conditions (0.91 ± 0.09 mmol/l in both conditions). There was an effect of time ($P < 0.0001$), an effect of the condition ($P = 0.0001$) but no interaction time \times condition ($P = 0.38$). No difference was observed for concentrations at T240 between F1 (1.29 ± 0.15 mmol/l) and F4 (1.38 ± 0.19 mmol/l) and for AUCs.

3.2.5. Carbohydrate oxidation

No difference was found in baseline carbohydrate oxidation (Fig. 5A). There was an effect of time ($P < 0.0001$) and an interaction time \times condition ($P = 0.0003$). Mean carbohydrate oxidation at T240 was significantly higher in F4 condition than in F1 (2.94 ± 0.15 vs. 2.11 ± 0.16 mg.kg⁻¹.min⁻¹, $P < 0.0001$). In F4 condition, total IAUC was significantly lower over the period 0–240 ($P = 0.004$). This difference is explained by a great difference over the period 0–120 ($P < 0.001$). No difference in IAUC was found for carbohydrate oxidation over the period 120–240. We found no difference between conditions for the 4 h carbohydrate balance ($P = 0.49$).

3.2.6. Lipid oxidation

No difference was found in baseline lipid oxidation (Fig. 5B). There was an effect of time ($P < 0.0001$) but no interaction time \times condition. Mean lipid oxidation at T240 was significantly lower in F4 condition than in F1 (0.44 ± 0.06 vs. 0.66 ± 0.07 mg.kg⁻¹.min⁻¹, $P = 0.004$). We found no difference between F1 and F4 for all lipid oxidation IAUCs and for the 4 h fat balance ($P = 0.49$).

3.2.7. RQ and diet induced thermogenesis

Over the T0 to T240 period, no difference between F1 and F4 was found for RQ (4 h RQ = 0.87 ± 0.01 for both conditions, $P = 0.44$), and for NPRQ (4 h NPRQ = 0.89 ± 0.01 for both conditions, $P = 0.44$). We found a significant decrease of DIT over the 0–240 period, in F4 condition comparing to F1 ($4.7 \pm 0.5\%$ vs. $6.2 \pm 0.6\%$ of the ECM, $P < 0.05$).

4. Discussion

The results of this study provide some evidence that an isocaloric increase of the number of eating episodes has a short-term positive impact on appetite control in normal-weight young men, considering subjective, behavioral and physiological aspects of appetite. We also demonstrated an impact on metabolic kinetics and a decrease in DIT.

4.1. Effect on appetite

We found that a breakfast consumed in four identical eating episodes hourly in the morning, compared to the same breakfast consumed in one eating episode induced a decrease of hunger and desire to eat just before lunch, particularly for food rich in energy and sweet food. This decrease of subjective appetite was corroborated by physiological measurements, as ghrelin and GLP-1 were both affected in the sense of decreasing hunger and increasing satiety before the next meal.

Eating behaviors during the subsequent ad libitum meal were also different: subjects consumed less, more precisely less lipids, after the breakfast in four eating episodes. There are a very limited number of experimental studies which have previously assessed the effect of increasing eating frequency on subjective appetite and energy intake in normal-weight subjects. Speechly et al. [23], compared subjective appetite and ad libitum intake of cottage pie and orange juice in eight lean males, after having consumed a breakfast in five vs. one eating episodes. After the breakfast in five eating episodes, they found that subjects ate significantly less during this single-course meal. Subjective appetite scores were also in line with our results even if the difference before lunch was not significant, certainly because of the small number of subjects [47]. A study by Lemmens et al. [28] corroborates our findings, showing a lower level of subjective appetite after

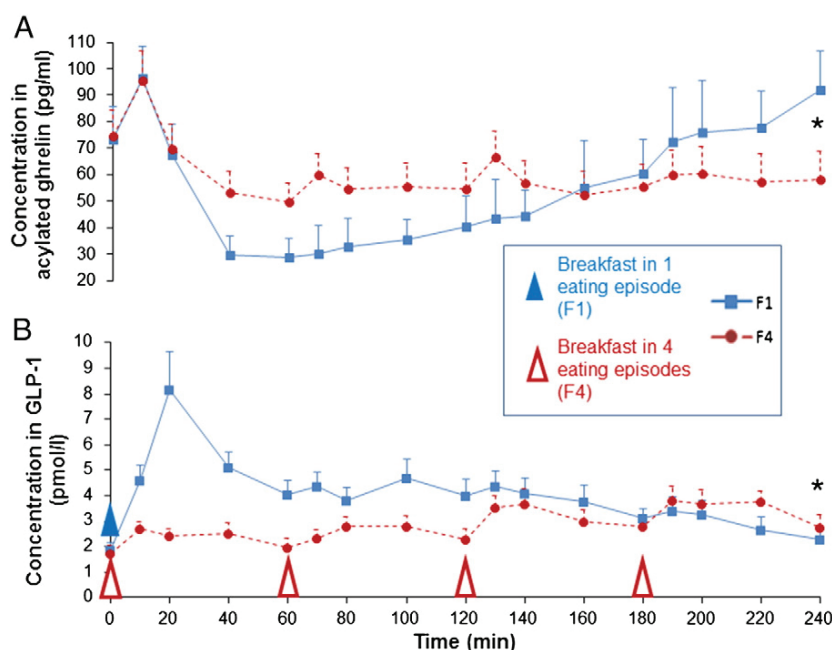


Fig. 3. Kinetics for acylated ghrelin (A) and GLP-1 (B) plasma concentrations between T0 and T240. * indicates that $P < 0.05$ where P values are results for the test comparing F1 vs. F4 values at T240.

a staggered meal eaten in 2 h, with 3 within-meal pauses, compared to a non-staggered meal ingested in 0.5 h. However, another study [24] showed no difference in subjective appetite before the subsequent meal after a six-eating episode vs. a two-eating episode pattern, but in this study ad libitum intake was not measured.

To our knowledge, the present study is the first to assess the effect of an experimental increase in eating frequency on eating behaviors beyond the unique measure of total energy intake. The decrease in fat intake that was observed could be beneficial. Nevertheless, it would be necessary to run longer term studies in order to assess if such an effect could be prolonged over a longer period of time.

The effects of spreading out a breakfast over the course of the morning were particularly observed during the last temporal quarter of the subsequent lunch, where a lower energy intake was observed, due to a significant decrease in lipid consumption. Temporal aspects of the meal have not been assessed in previous experimental studies on the short-term effect of increasing eating frequency on appetite control [23–25]. We think that such an approach should be encouraged for better understanding of how a particular variable of interest can lead to a better control of appetite.

Moreover, in our study, an effort was made to preserve the ecological character of the eating situation. As previously pointed out, the influence of ambiance on eating behavior and the magnitude of its effect, particularly physical surroundings, is generally underestimated or not taken into account in food intake studies [34]. We demonstrated that hunger scores and desire to eat were lower in the Clinical Investigation Centre where blood sampling and calorimetric measurements were performed, compared to the experimental restaurant without concomitant measurements, even if the shapes of VAS kinetics were the same. These results confirm the importance of taking care of the context and the environment when studying eating behaviors [33,48] and particularly in satiety research [32], in order to increase the external validity of studies exploring the effects of specific interventions on appetite and subsequent intakes. We found in this ecological context a positive correlation between the level of hunger before the meal and subsequent ad libitum energy intake, using a within-subject analysis. This result is in line with previous studies [40,49].

Regarding biomarkers of appetite, we found, after the breakfast in four eating episodes, a decreased concentration in acylated ghrelin and an increased concentration in GLP-1 just before the subsequent meal, compared to the breakfast in one eating episode. Our findings are in accordance with the study of Lemmens et al. which involved, like our study, normal-weight young adults [28]. In line with another study [27], we found no difference in AUC ghrelin response over the whole study period.

Considering the above, the current study provides evidence that increasing eating frequency may help to decrease the level of hunger and the desire to eat of normal-weight adults before a subsequent meal. Subjective and physiological differences before lunch affected intakes during the subsequent meal. In particular, fat intake was decreased. This confirms, as already proposed [50] that increasing eating frequency may be an adequate strategy for better control of appetite and weight management in normal-weight adults.

Nevertheless, one limit of this study is that we only recruited subjects with a habitual 3 or 4 meal pattern. It has been shown previously that habitual nibblers (5–7 eating episodes per day) were more able to regulate their energy intake compared to habitual gorgers (3–4 eating episodes per day) [16,17]. It would be necessary to assess the effect of an isocaloric increase of eating frequency in habitual nibblers. Moreover, we only proposed to our subjects to adjust their energy intake during an ad libitum lunch offered at a fixed hour (12:00). This choice was done because all subjects were habitual lunch eaters, and because in France, for cultural and social reasons, lunchtime is still mainly between 12:00 and 1:00 pm [51]. However, it should be assessed how subjects (habitual gorgers or nibblers) would regulate their food intakes with access to additional food apart from the ad libitum lunch, such as proposed in other protocols [52], and/or when this ad libitum lunch is not time fixed but given on spontaneous request [14,15].

4.2. Effect on metabolism

Eating small and frequent meals compared to one large meal had a significant effect on glucose and insulin short-term kinetics in our study. A large breakfast induced sharp glucose and insulin excursions

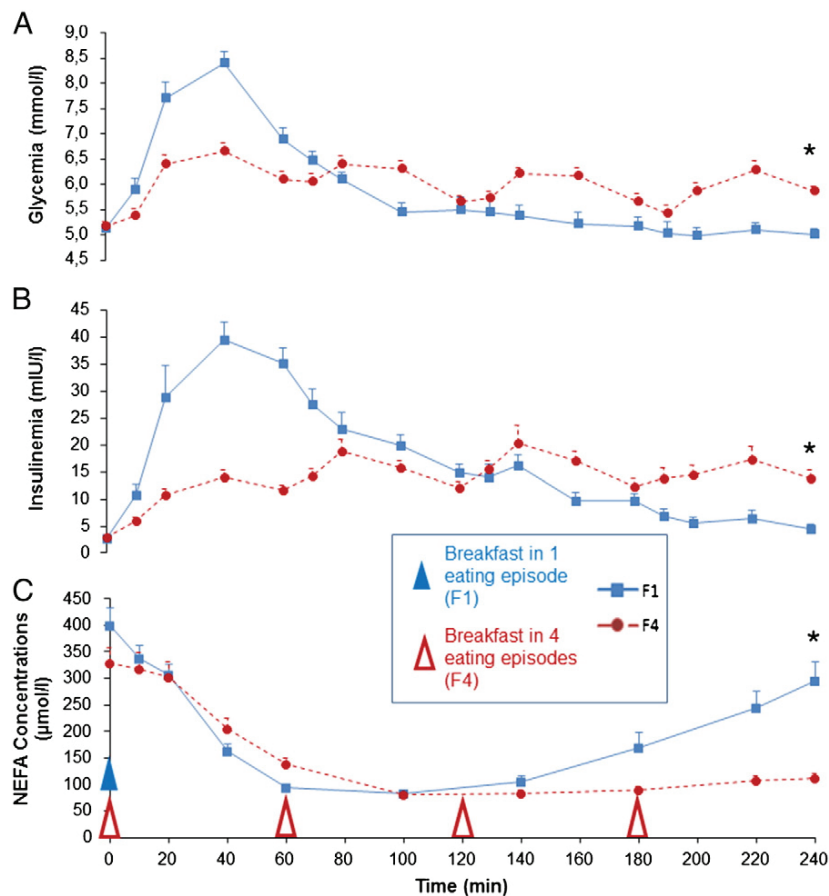


Fig. 4. Kinetics for glucose (A), insulin (B) and NEFA (C) plasma concentrations between T0 and T240. * indicates that $P < 0.05$ where P values are results for the test comparing F1 vs. F4 values at T240.

that were absent in the four smaller eating episodes condition. The AUC for glucose was found to be independent of the condition. In contrast, the insulin AUC decreased when the frequency of eating increased. In response to the same energy intake over the period, less insulin was produced in the high eating frequency condition compared to the low eating frequency condition. This finding is in accordance with most of the previous studies that assessed the short-term effects of different meal frequency on metabolism [53–56]. A recent study [57] found a lower 12-h insulin AUC in a six-meal condition compared to the isocaloric three-meal condition. In contrast with our results, Solomon et al. [27] found no difference in insulin AUC comparing a two-meal vs. a twelve-meal ingestion pattern.

As insulin inhibits lipolysis and promotes lipogenesis [58], it has previously been pointed out that the decrease in plasma insulin associated with increased meal frequency may contribute to decreasing body fat deposition [7]. We found a significant decrease in plasma NEFA AUC when increasing eating frequency. Plasma NEFA concentration reflects lipolysis activity [58]. Thus, the decrease in total insulin production in F4 condition did not lead to a higher lipolysis that would have been reflected by higher NEFA concentrations. We assume that insulin kinetics would be more important than total insulin production. We observed that a ≈ 10 mIU/l increase of insulin concentration in F4 condition induced the same decrease in NEFA concentration than a ≈ 30 mIU/l increase of insulin concentration in F1. It has previously been shown that lipolysis was very sensitive to minor increase in plasma insulin concentration [59]. Furthermore, in our study, the maintenance of insulin concentration at an intermediate level, with no return to baseline, may have been sufficient to inhibit lipolysis during the whole study period. Considering the above, the loss of inter-prandial fast, characterized by the maintenance of insulin concentrations above baseline, and induced by the increase in eating frequency,

would have a deleterious effect. The return to baseline concentration for insulin seems to play a key role in order to orientate the organism to a lipolysis pattern.

It has also previously been hypothesized that reduced insulin secretion would induce a switch from carbohydrate oxidation to lipid oxidation in people who eat more frequently [60]. We found a decrease in carbohydrate oxidation in the F4 condition that would confirm this hypothesis but the breakfast eaten in four vs. one eating episodes did not induce any differences in lipid oxidation, 4 h RQ, NPRQ, fat and carbohydrate balance. In line with our results, Smeets et al. [29] found a significant decrease in 24-h carbohydrate oxidation in a three-meal condition compared to a two-meal condition. Contrary to the present study, they found an increased 24 h fat oxidation and a decrease in NPRQ in the three-meal condition. Smeets et al. studied the effect of eating frequency over a longer period, but in the lower range of meal frequency, thus their subjects did not experiment a loss of inter-prandial fast as we have done in the present study.

It has often been theorized that increased eating frequency may be able to positively influence DIT [61], but experimental studies designed to influence the effect of eating frequency on DIT have yielded contradictory results [60]. Some authors concluded that increasing meal frequency had no effect on DIT [9,29,61], a positive effect [30] or a deleterious effect [31]. Smeets et al. [29] measured the effect of meal frequency (2 vs. 3 meals) on DIT over 24 h and found no effect. Such 24 h studies should be run in a higher range of meal frequency before concluding on a deleterious effect of increasing eating frequency on DIT. However, even if the decrease in DIT was minor in the present study and measurements were only performed during a 4 h period, this should be taken into account considering a longer run perspective.

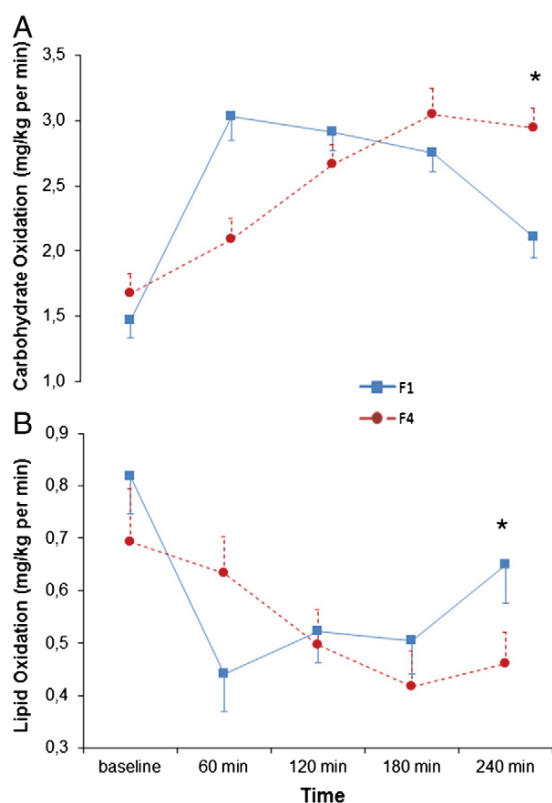


Fig. 5. Carbohydrate and lipid oxidation between baseline and T240. * indicates that $P < 0.05$ where P values are results for the test comparing F1 vs. F4 values at T240.

Overall, the effect of increasing eating frequency on metabolism is debatable: a higher number of eating episodes decreased global insulin response that could be seen as favorable, but on the contrary, the loss of the inter-prandial fast was associated with an inhibition of lipolysis and a decrease in energy expenditure.

5. Conclusion

The present study supports the cause that the isocaloric increase of eating frequency may contribute to improving appetite control by reducing hunger, decreasing ghrelin concentration and increasing GLP-1 concentration in normal weight men. We demonstrated that increasing eating frequency could also help to reduce fat intake at the subsequent meal. The inhibition of the lipolysis activity reflected by NEFA profiles, and the reduction of diet induced thermogenesis we observed during the study period could cause weight gain in a long run perspective. More integrated research should be done in order to better understand the effects of eating frequency on appetite and metabolism, particularly in obese subjects that potentially suffer from metabolic dysregulation or appetite deregulation.

Acknowledgments

This study was supported by the Foundation Nestlé France. We thank Agnes Giboreau, research director of the Institut Paul Bocuse Research Centre for her support at each step of the study. We are also grateful for the contribution from the members of the Institut Paul Bocuse and of the Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes.

References

- [1] Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *JAMA* 2003;289:76–9.
- [2] Palmer MA, Capra S, Baines SK. Association between eating frequency, weight, and health. *Nutr Rev* 2009;67:379–90.
- [3] Mattson MP. The need for controlled studies of the effects of meal frequency on health. *Lancet* 2005;365:1978–80.
- [4] Fabry P, Hejl Z, Fodor J, Braun T, Zvolankova K. The frequency of meals. Its relation to overweight, hypercholesterolaemia, and decreased glucose-tolerance. *Lancet* 1964;2:614–5.
- [5] Kant AK, Schatzkin A, Graubard BI, Ballard-Barbash R. Frequency of eating occasions and weight change in the NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:468–74.
- [6] Titan SM, Bingham S, Welch A, Luben R, Oakes S, Day N, et al. Frequency of eating and concentrations of serum cholesterol in the Norfolk population of the European prospective investigation into cancer (EPIC-Norfolk): cross sectional study. *BMJ* 2001;323:1286–8.
- [7] Ma Y, Bertone ER, Stanek III EJ, Reed GW, Hebert JR, Cohen NL, et al. Association between eating patterns and obesity in a free-living US adult population. *Am J Epidemiol* 2003;158:85–92.
- [8] McCrory MA, Howarth NC, Roberts SB, Huang TT. Eating frequency and energy regulation in free-living adults consuming self-selected diets. *J Nutr* 2011;141:148–53.
- [9] Bellisle F, McDevitt R, Prentice AM. Meal frequency and energy balance. *Br J Nutr* 1997;77(Suppl. 1):S57–70.
- [10] Huang TT, Roberts SB, Howarth NC, McCrory MA. Effect of screening out implausible energy intake reports on relationships between diet and BMI. *Obes Res* 2005;13:1205–17.
- [11] Farshchi HR, Taylor MA, Macdonald IA. Decreased thermic effect of food after an irregular compared with a regular meal pattern in healthy lean women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:653–60.
- [12] Farshchi HR, Taylor MA, Macdonald IA. Regular meal frequency creates more appropriate insulin sensitivity and lipid profiles compared with irregular meal frequency in healthy lean women. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1071–7.
- [13] Farshchi HR, Taylor MA, Macdonald IA. Beneficial metabolic effects of regular meal frequency on dietary thermogenesis, insulin sensitivity, and fasting lipid profiles in healthy obese women. *Am J Clin Nutr* 2005;81:16–24.
- [14] Marmonier C, Chapelot D, Fantino M, Louis-Sylvestre J. Snacks consumed in a nonhungry state have poor satiating efficiency: influence of snack composition on substrate utilization and hunger. *Am J Clin Nutr* 2002;76:518–28.
- [15] Marmonier C, Chapelot D, Louis-Sylvestre J. Metabolic and behavioral consequences of a snack consumed in a satiety state. *Am J Clin Nutr* 1999;70:854–66.
- [16] Westerterp-Plantenga MS, Kovacs EM, Melanson KJ. Habitual meal frequency and energy intake regulation in partially temporally isolated men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:102–10.
- [17] Westerterp-Plantenga MS, Wijckmans-Duysens NA, ten Hoor F. Food intake in the daily environment after energy-reduced lunch, related to habitual meal frequency. *Appetite* 1994;22:173–82.
- [18] Chapelot D, Marmonier C, Aubert R, Gausseres N, Louis-Sylvestre J. A role for glucose and insulin preprandial profiles to differentiate meals and snacks. *Physiol Behav* 2004;80:721–31.
- [19] Bellisle F. Hunger and satiety, control of food intake (Faim et satiété, contrôle de la prise alimentaire). *EMC – Endocrinologie* 2005;2:179–97.
- [20] de Graaf C, Blom WA, Smeets PA, Stafleu A, Hendriks HF. Biomarkers of satiation and satiety. *Am J Clin Nutr* 2004;79:946–61.
- [21] Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5992.
- [22] Naslund E, Barkeling B, King N, Gutniak M, Blundell JE, Holst JJ, et al. Energy intake and appetite are suppressed by glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:304–11.
- [23] Speechly DP, Buffenstein R. Greater appetite control associated with an increased frequency of eating in lean males. *Appetite* 1999;33:285–97.
- [24] Jackson SJ, Leahy FE, Jebb SA, Prentice AM, Coward WA, Bluck LJ. Frequent feeding delays the gastric emptying of a subsequent meal. *Appetite* 2007;48:199–205.
- [25] Leahy FE, Jebb SA, Moore MS, Prentice AM. Effect of meal frequency and exercise on subsequent energy intake in lean men. *Int J Obes (Lond)* 2000;24(Suppl. 1):S15.
- [26] Leidy HJ, Armstrong CL, Tang M, Mattes RD, Campbell WW. The influence of higher protein intake and greater eating frequency on appetite control in overweight and obese men. *Obesity* 2010;18:1725–32.
- [27] Solomon TP, Chambers ES, Jeukendrup AE, Toogood AA, Blannin AK. The effect of feeding frequency on insulin and ghrelin responses in human subjects. *Br J Nutr* 2008;100:810–9.
- [28] Lemmens SG, Martens EA, Born JM, Martens MJ, Westerterp-Plantenga MS. Staggered meal consumption facilitates appetite control without affecting postprandial energy intake. *J Nutr* 2011;141:482–8.
- [29] Smeets AJ, Westerterp-Plantenga MS. Acute effects on metabolism and appetite profile of one meal difference in the lower range of meal frequency. *Br J Nutr* 2008;99:1316–21.
- [30] LeBlanc J, Mercier I, Nadeau A. Components of postprandial thermogenesis in relation to meal frequency in humans. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;71:879–83.
- [31] Tai MM, Castillo P, Pi-Sunyer FX. Meal size and frequency: effect on the thermic effect of food. *Am J Clin Nutr* 1991;54:783–7.
- [32] Alliro X, Saulais L, Disse E, Nazare JA, Cazal C, Laville M. Integrating behavioral measurements in physiological approaches of satiety. *Food Qual Pref* 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodqual.2011.05.005>.

- [33] Meiselman HL. The impact of context and environment on consumer food choice. In: Frewer L, van Trijp H, editors. *Understanding consumers of food products*. Cambridge: Woodhead; 2007. p. 67–92.
- [34] Stroebele N, De Castro JM. Effect of ambience on food intake and food choice. *Nutrition* 2004;20:821–38.
- [35] Van Strien T, Frijters J, Bergers G, Defares P. The Dutch Eating Behavior Questionnaire (DEBQ) for assessment of restrained, emotional, and external eating behavior. *Int J Eat Disord* 1986;5:295–315.
- [36] Lluh A, Kahn J, Stricker-Krongrad A, Ziegler O, Drouin P, Mejean L. Internal validation of a French version of the Dutch eating behaviour questionnaire. *Eur Psychiatry* 1996;11:198–203.
- [37] Stunkard AJ, Messick S. The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. *J Psychosom Res* 1985;29:71–83.
- [38] Lluh A. Identification des conduits alimentaires par approches nutritionnelles et psychométriques: implications thérapeutiques et préventives dans l'obésité humaine. Nancy: University Henri Poincaré; 1995 [Nancy 1].
- [39] Giboreau A, Fleury H. A new research platform to contribute to the pleasure of eating and healthy food behaviors through academic and applied food and hospitality research. *Food Qual Pref* 2009;20:533–6.
- [40] Alliot X, Saulais L, Disse E, Roth H, Cazal C, Laville M. Validation of a buffet meal design in an experimental restaurant. *Appetite* 2012;58:889–97.
- [41] Almiron-Roig E, Green H, Virgili R, Aeschlimann JM, Moser M, Erkner A. Validation of a new hand-held electronic appetite rating system against the pen and paper method. *Appetite* 2009;53:465–8.
- [42] Blond E, Maitrepierre C, Normand S, Sothier M, Roth H, Goudable J, et al. A new indirect calorimeter is accurate and reliable for measuring basal energy expenditure, thermic effect of food and substrate oxidation in obese and healthy subjects. *E Spen Eur E J Clin Nutr Metab* 2011;6:e7-15.
- [43] Ferrannini E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism* 1988;37:287–301.
- [44] Arock M, Desnault H, Viars P, Guilloson JJ. Determination of total nitrogen in biological milieu by chemoluminescence: a comparison with the reference method. *Ann Biol Clin (Paris)* 1985;43:872–4.
- [45] Yeh KC, Kwan KC. A comparison of numerical integrating algorithms by trapezoidal, Lagrange, and spline approximation. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978;6:79–98.
- [46] Nazare JA, Sauvinet V, Normand S, Guerin-Deremaux L, Gabert L, Desage M, et al. Impact of a resistant dextrin with a prolonged oxidation pattern on day-long ghrelin profile. *J Am Coll Nutr* 2011;30:63–72.
- [47] Halford JC, Harrold JA. Satiety-enhancing products for appetite control: science and regulation of functional foods for weight management. *Proc Nutr Soc* 2012;1–13.
- [48] Larson N, Story M. A review of environmental influences on food choices. *Ann Behav Med* 2009;38(Suppl. 1):S56–73.
- [49] Flint A, Raben A, Blundell JE, Astrup A. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:38–48.
- [50] La Bounty PM, Campbell BI, Wilson J, Galvan E, Berardi J, Kleiner SM, et al. International Society of Sports Nutrition position stand: meal frequency. *J Int Soc Sports Nutr* 2011;8:4.
- [51] de Saint Pol T. Quand est-ce qu'on mange?: Le temps des repas en France (analyse quantitative). *Terrains & travaux*; 2005. p. 51–72.
- [52] Taylor MA, Garrow JS. Compared with nibbling, neither gorging nor a morning fast affect short-term energy balance in obese patients in a chamber calorimeter. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:519–28.
- [53] Jenkins DJ, Wolever TM, Ocana AM, Vuksan V, Cunnane SC, Jenkins M, et al. Metabolic effects of reducing rate of glucose ingestion by single bolus versus continuous sipping. *Diabetes* 1990;39:775–81.
- [54] Wolever TM. Metabolic effects of continuous feeding. *Metabolism* 1990;39:947–51.
- [55] Jones PJ, Leitch CA, Pederson RA. Meal-frequency effects on plasma hormone concentrations and cholesterol synthesis in humans. *Am J Clin Nutr* 1993;57:868–74.
- [56] Jenkins DJ, Wolever TM, Vuksan V, Brighenti F, Cunnane SC, Rao AV, et al. Nibbling versus gorging: metabolic advantages of increased meal frequency. *N Engl J Med* 1989;321:929–34.
- [57] Holmstrup ME, Owens CM, Fairchild TJ, Kanaley JA. Effect of meal frequency on glucose and insulin excursions over the course of a day. *E Spen Eur E J Clin Nutr Metab* 2010;5:e277–80.
- [58] Dimitriadis G, Mitron P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;93(Suppl. 1):S52–9.
- [59] Jensen MD, Caruso M, Heiling V, Miles JM. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* 1989;38:1595–601.
- [60] Vitapole Danone. *Eating frequency and health (Nutrition and Health collection)*. Montrouge: John Libbey Eurotext; 2004.
- [61] Kinabo JL, Durnin JV. Effect of meal frequency on the thermic effect of food in women. *Eur J Clin Nutr* 1990;44:389–95.

Annexe 10 : Effects of breakfast spread out over time on the food intake at lunch and the hormonal responses in obese men

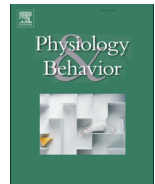
Physiology & Behavior 127 (2014) 37–44



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phb



Effects of a breakfast spread out over time on the food intake at lunch and the hormonal responses in obese men



Xavier Alliro ^{a,b,c,*}, Kevin Seyssel ^{b,c,e}, Laure Saulais ^{a,c}, Hubert Roth ^{b,d}, Anne Charrié ^{b,c,e}, Jocelyne Drai ^e, Joelle Goudable ^{c,e}, Emilie Blond ^{b,c,e}, Emmanuel Disse ^{b,c}, Martine Laville ^{b,c}

^a Centre de Recherche de l'Institut Paul Bocuse, Château du Vivier, 69130 Ecully, France

^b Centre de Recherche en Nutrition Humaine Rhône-Alpes, Centre Hospitalier Lyon Sud, 69310 Pierre Bénite, France

^c Centre Européen pour la Nutrition & la Santé (CENS), Lyon, France

^d Pôle Recherche, CHU Grenoble – Inserm U1055-Bioénergétique, Université J. Fourier, Grenoble, France

^e Faculté de Médecine de Maïeutique Lyon Sud, Charles Mérieux-F69495 Pierre-Bénite, CarMeN-INSERM U1060-Université Claude Bernard Lyon 1, France

HIGHLIGHTS

- An isocaloric spread out breakfast decreased appetite before lunch in obese men.
- Ghrelin concentration before lunch was decreased after a spread out breakfast.
- Increasing eating episodes in the morning did not reduce energy intake at lunch.
- A spread out breakfast in obese men reduced lipolysis and diet induced thermogenesis.
- Frequent eating was not found to be an adequate strategy to lose weight in obese men.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 August 2013

Received in revised form 16 December 2013

Accepted 14 January 2014

Available online 25 January 2014

Keywords:

Eating frequency

Appetite control

Satiety

Ghrelin

Food intake

Glucagon-like peptide-1

ABSTRACT

The effects of frequent eating on health and particularly on appetite and metabolism are unclear. We have previously shown that frequent eating decreased appetite and energy intake at the subsequent meal in lean men. In the present study, we tested the same pattern in obese subjects. Seventeen obese men participated in: (i) two sessions consisting of a breakfast consumed in one eating episode at T0 (F1), or in four isocaloric eating episodes at T0, T60, T120, and T180 min (F4), followed by an ad libitum buffet (T240) in an experimental restaurant. Subjects rated their appetite throughout the sessions. (ii) two sessions consisting of the same breakfasts F1 and F4 in a Clinical Centre, followed by a standardized meal. Blood sampling was performed to study ghrelin, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), and metabolic kinetics. Indirect calorimetry measurements were performed. After F4, at T240 min, ghrelin concentration ($P = 0.03$) and hunger ratings ($P < 0.001$) were lower while GLP-1 concentration ($P = 0.006$) and satiety ratings ($P = 0.02$) were higher. In F4, subjects consumed at the buffet, less food in grams ($P = 0.04$) and less energy from low energy dense foods ($P = 0.01$), but total energy intakes were not different between conditions. In F4, the area under the curve was lower for insulin ($P = 0.02$) and non-esterified fatty acids (NEFA) ($P = 0.03$). Diet induced thermogenesis was reduced in F4 ($P = 0.03$) between T0 and T240. Even if subjective and physiological data suggest a beneficial effect of frequent eating on appetite in obese men, no effect was demonstrated on energy intake. Moreover, the decrease in diet induced thermogenesis and lipolysis, reflected by NEFA profiles, could be deleterious on energy balance in the long run.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Obesity is a major cause of morbidity and mortality in Western societies. Obesity is explained by an energy imbalance with energy intake exceeding energy expenditure. Increasing eating frequency has been hypothesized to decrease hunger and to improve satiety.

Some authors demonstrated a decrease in hunger sensations and/or in energy intake while consuming smaller more frequent meals [1–3]; others did not confirm these results [4] or even led to opposite conclusions [5]. Regarding the effects on potential biomarkers of appetite [6], such as ghrelin and glucagon-like peptide-1 (GLP-1), the literature is not well documented and is contradictory [5,7–9].

Recently, our research group demonstrated the interest of an integrated approach for assessing the effects of parameters of interest on satiety [10], combining an in-depth behavioral exploration to physiological measurements in two specific places. Using the previously mentioned

* Corresponding author at: Basque Culinary Center, Paseo Juan Avelino Barriola, 101 20009 San Sebastián, Spain. Tel.: +34 943 574 533.

E-mail address: xalliro@bculinary.com (X. Alliro).

methodology, we demonstrated that increasing eating frequency could contribute to control better appetite in lean men [11]. Increasing the number of eating episodes had also effects on metabolic kinetics and diet induced thermogenesis (DIT) [11] while effects on substrate oxidation have already been reported [3,12,13]. As already highlighted in various papers [8,11,14], obese individuals may have specific responses to changes in eating frequency, considering metabolic aspects [8] and appetite control [14]. Concerning appetite control, not only the subjective ratings of appetite have to be recorded, but also the behavioral aspects of appetite have to be taken into account. Indeed, the subjective responses have already shown identical patterns between lean and obese subjects while behavioral data differed, in response to a different feeding frequency [14].

Despite the lack of clear scientific evidence to justify it, obese individuals are particularly targeted by dietary guidelines to eat smaller and more frequent meals in order to control appetite better and lose weight [5,15].

Considering the above, we designed this study in order to clarify the effect of increasing the frequency of eating episodes in obese subjects, on appetite and energy balance. The objective of the present study was to assess, in obese men, the short-term consequences of an isocaloric increase of eating frequency:

- on appetite, through the assessment of:
 - subjective and physiological data before the subsequent meal,
 - behavioral data: food intake during the subsequent ad libitum meal designed in a normal-eating context,
- on metabolism, through the assessment of metabolic kinetics, substrate oxidation and energy expenditure.

2. Material and methods

2.1. Subjects

Seventeen obese men were recruited through advertisements and completed the study (Table 1). Subjects were eligible if they had normal fasting plasma glucose and cholesterol and triglyceride (TG) concentration. All subjects reported less than 4 h of physical activity per week, were non-smokers and were used to eating breakfast and lunch. Subjects should have normal scores for the Dutch Eating Behavior Questionnaire [16,17] and the Three Eating Factor Questionnaire [18,19].

Subjects gave their written consent to participate in the study. The SAFRAN study was approved by the Scientific Ethics Committee of Lyon Sud Est II and ANSM (French agency for Drug and Health Products Safety) and complied with both the French Huriet–Serusclat law and the second declaration of Helsinki. The study was registered at Clinical Trials (registration number: NCT01573988).

Table 1
Anthropometric and fasting metabolic parameters of the 17 obese subjects.

| | Mean ± SEM |
|------------------------------|-------------|
| Anthropometric parameters | |
| Age (years) | 28.6 ± 1.5 |
| Body weight (kg) | 102.4 ± 2.2 |
| BMI (kg/m ²) | 31.9 ± 0.4 |
| Waist circumference (cm) | 108.5 ± 1.4 |
| Fasting metabolic parameters | |
| Glucose (mmol/L) | 5.35 ± 0.12 |
| Insulin (mIU/L) | 5.62 ± 0.41 |
| HOMA | 1.14 ± 0.14 |
| Total cholesterol (mmol/L) | 5.39 ± 0.17 |
| HDL cholesterol (mmol/L) | 1.06 ± 0.03 |
| LDL cholesterol (mmol/L) | 3.43 ± 0.17 |
| TG (mmol/L) | 1.96 ± 0.18 |

2.2. Study design

The study was conducted following a randomized cross-over design, used in lean subjects and already described [11].

Briefly, after being included, the subjects had a first visit for a lunch at the experimental restaurant [20] of Institut Paul Bocuse Research Centre (IPB). The aim of this first visit was to familiarize the subjects with the environment and the foods which would be used during the study. During this visit, subjects were invited to the experimental restaurant at 12:00 and were asked to taste all of the food items offered at an individual buffet-type meal. A choice of classical hot and cold French food items with varied macronutrient compositions was offered. For analysis, these food items have been classified in two categories: high energy density (HED) and low energy density (LED). HED food items were “pâté de campagne”, fried potatoes, sausages, cheese (“Comté”), chocolate cake and sugar. LED food items were grated carrots, rice, French beans, chicken breast, cottage cheese, stewed fruit and white bread. The energy content and macronutrient composition of these food items are described in a previous validation study [21]. Subjects were instructed to eat ad libitum. The mean rating of food items, measured on a 100 mm electronic visual analog scale (VAS), varied from 4.4 ± 0.4 (for grated carrots), to 7.5 ± 0.4 (for “Comté”).

After this first visit, the subjects were then invited to four experimental sessions, in a randomized order, each session separated by at least 7 days: two were conducted in IPB for behavioral explorations; the other two took place in Rhône-Alpes Research Centre for Human Nutrition (CRNH) for metabolic explorations. The interest of duplicating the same protocol in two sites, one specialized in clinical nutrition (CRNH), the other equipped for studying with precision eating behaviors during a meal (IPB), has been described in a previous paper [10].

The order of these four sessions was randomized across the participants to prevent any order effect. The random allocation sequences were generated by a biostatistician using a 2-step randomization (i) for the center order (CRNH first or IPB first) and (ii) for the eating frequency order (F1 first or F4 first) in each center. The size of the balanced blocks was 4 and the software used Stata 11 (Stata Corp., College Station, TX). Subjects were requested to avoid vigorous activities and to abstain from alcohol consumption the day before each session. Subjects were also asked to select a dinner they consume regularly and to eat this same meal the evening before each session. They were also instructed to finish eating this dinner by 9:00 pm and to eat nothing else after this time.

For the four sessions, the subjects were given each time the same 674.8 kcal breakfast, either in one – 20 min long – eating episode at T0 (8:00 am) (F1 condition) or in four – 10 min long – 168.7 kcal identical spaced presentations provided every hour at T0, T60, T120 and T180 min (F4 condition). The breakfast in F1 was composed of white bread (40 g), croissant (80 g), strawberry jam (30 g), unsalted butter (10 g), orange juice (120 g), white sugar (10 g), and black coffee or tea (400 ml). For each of the four eating episodes of F4, these quantities were divided by 4. Subjects were asked to eat all the food provided for breakfast. They received both breakfasts (F1 and F4) on two occasions: once in the IPB, once in the CRNH.

2.3. Behavioral explorations (IPB)

Subjects came twice to the IPB in groups of five subjects. During the experiment, they were free to read, watch movies, listen to music or work on a computer.

Electronic visual analog scales (VAS) were used to assess feelings of hunger and satiety. VAS were completed at T0, T20, T80, T140, T200, T240 (secondary outcome measure), T270, T330 and T390 min. Each electronic VAS consisted of a 70 mm line [22], presented on Dell Netbook (Latitude 2100 model, Dell Inc., Round Rock, TX, USA) anchored at the beginning and the end by opposing statements such as: “not hungry at all” and “extremely hungry”, in response to the question:

“how hungry do you feel?”. Subjects were requested to click on the line that best matched how they were feeling at the time. FIZZ Sensory Software 2.40H by Biosystèmes (Couteron, France) was used for automatic data capture and transforming results in a 0 to 10 score.

For lunch at T240 min (12:00), the subjects were offered exactly the same eating situation each time, as described elsewhere [10,11]. Each food item that was previously tasted in the first visit was offered in larger quantities than the expected intake. The subjects were invited to eat as long as they wanted, until they were comfortably satisfied.

Weighing of food before and after the meal enabled us to collect: mean energy density of the meal, energy (secondary outcome measure), carbohydrate, lipid and protein intake for the whole meal, energy intake from HED and LED food. Total energy intake has been expressed in kcal and in % of the individual daily energy requirement (DER) of the subjects, based upon their basal metabolic rate measured by indirect calorimetry in the CRNH (mean of F1 and F4) multiplied by a 1.375 coefficient corresponding to a moderate physical activity level [23].

2.4. Metabolic explorations (CRNH)

Each subject came twice to the CRNH. When the subjects arrived, an i.v. catheter was inserted into the antecubital vein for blood sampling for the measurement of plasma acylated ghrelin (the primary outcome measure was the concentration of acylated ghrelin at T240), glucagon-like peptide-1 (GLP-1), glucose, insulin, and non-esterified fatty acid (NEFA) concentrations. As described [11], the subjects stayed in a bed for the whole experiment as continuous indirect calorimetry measurements were performed but they were not allowed to sleep. At T240 min, subjects were instructed to eat an entire standardized lunch (1041 kcal; carbohydrate: 53.1%, lipid: 30.6%, protein: 16.3%).

Venous blood samples were collected for metabolites and hormones. For acylated ghrelin, blood samples were collected in EDTA-plasma tubes; para-hydroxymercuribenzoic acid in HCl (1 mM in the final sample volume) was immediately added to plasma to prevent degradation of acylated ghrelin by protease. For GLP-1 collection, EDTA-plasma tubes with dipeptidyl peptidase IV inhibitor were used. After collection, all blood samples were centrifuged for 10 min at 4 °C at 4500 rpm. The plasma samples were immediately stored at –23 °C until analysis.

Metabolites and hormones were measured by standard methods as already described [11].

Indirect calorimetry measurements were performed during the basal period (T–30 to T0), and from T0 to T430 min. We used the DELTATRAC II™ calorimeter (Datex instrumentary corporation, Helsinki, Finland) and the QUARK RMR (Cosmed, Rome, Italy). Data obtained from these two calorimeters have shown equivalency [24]. Substrate oxidation, resting metabolic rate (RMR) and energy expenditure (EE) were calculated with Ferrannini's equation [25]. All the results were obtained from the average of each 30 min period. Diet induced thermogenesis (DIT), i.e. the increment of EE above basal resting metabolic rate (RMR) was calculated with the following formula:

$$\%DIT = \left[\sum (PPMR - RMR) \times \text{Time} \right] / ECM$$

with PPMR: postprandial metabolic rate in kcal/min, RMR: resting metabolic rate in kcal/min, Time: time of measurement (min), and ECM: energy content of meal (kcal).

In order to calculate protein oxidation, urine samples were collected three times during the day (T0, T240 and T430) and the urinary nitrogen content was measured using a chemiluminescence method [26] (Antek 7000, Alytek, Juvisy, France).

2.5. Statistical analysis

The normality of each parameter was checked using the Shapiro–Wilk test. To test for the differences between F1 and F4, we used the

Student's paired *t*-test when the distribution of the variable was normal, and the Wilcoxon paired test when the distribution of the variable was not normal. We tested the differences between F1 and F4: for total energy and macronutrient intake during the ad libitum meal, for all VAS parameters at T0 and at T240 and for biological variables at T0 and at T240. For biological variables, we also tested the difference between baseline and T240 for the same condition.

We used mixed models to compare the kinetics of appetite scores for the 0–390 period and the kinetics of biological variables for the 0–430 period. The dependent variable was the appetite score or the biological variable. The condition, the time and the interaction time × condition were considered as fixed effects. The subjects were considered as a random effect.

Total 430 min area under the curve (AUC) was calculated from the fasting (baseline) time point and the 23 postprandial time points for each biological variable (16 for NEFA). We further divided the testing day into two segments: from 0 to 240 min, and from 240 to 430 min and calculated individual AUC for each variable for these periods. For energy expenditure, substrate oxidation, incremental areas under the curve (IAUC) were calculated. For all AUC and IAUC measurements, the trapezoidal rule [27] was used.

All tests were two-sided and differences were considered significant at $P < 0.05$. Values are expressed as Mean ± Standard Error of Mean (SEM). JMP® 9 statistical software (SAS Institute Inc., NC, USA) was used for all the statistical analyses.

From a previous study led in our laboratory [28], we calculated that a minimum sample size of nineteen subjects was necessary to observe a significant difference in ghrelin plasma concentrations before lunch, after two different breakfasts (control vs. breakfast inducing a 40% decrease of glycemic excursion), with a significance level of 0.05 and a power of 80%. Furthermore, according to Speechly et al. [1], fourteen subjects were necessary to observe a significant difference in ad libitum intake at lunch after a breakfast in one vs. five intakes, with a significance level of 0.05 and a power of 80%. We included 19 subjects. Two of them stopped their participation in the study after the first familiarization visit in the IPB. All results are thus given for 17 subjects.

3. Results

3.1. Appetite

3.1.1. Subjective appetite (Fig. 1)

No baseline difference (T0) was found between F1 and F4 for all VAS scores. Over the whole 0–390 period, for all VAS parameters, there was an effect of time ($P < 0.0001$) and a time × condition interaction ($P < 0.02$).

Just before lunch (T240), F4 hunger scores were lower compared to the F1 scores ($P < 0.001$; Fig. 1A), and F4 satiety scores were higher compared to the F1 scores ($P = 0.02$; Fig. 1B).

No difference was found between T240 and T0 for F1 hunger scores and for F1 satiety scores. However, for F4, hunger score at T240 was lower compared to the hunger score at T0 ($P = 0.005$). F4 satiety score at T240 was higher compared to the F4 satiety score at T0 ($P = 0.009$).

3.1.2. Food intake during the ad libitum buffet meal (Table 2)

No difference in total energy, carbohydrate, lipid and protein intakes and the mean energy density of food eaten was found between F1 and F4. Nevertheless, the subjects consumed a decreased quantity of food in grams in F4 ($P = 0.04$). Also, in F4 subjects consumed less energy from LED food items ($P = 0.01$). No difference was found for energy intake from HED food items.

3.1.3. Ghrelin and GLP1 (Fig. 2A–B)

Baseline concentrations did not differ between conditions.

There was a time × condition interaction ($P < 0.0001$) for ghrelin. At T240, acylated ghrelin concentration was lower in F4 (16.5 ± 3.4 pg/mL

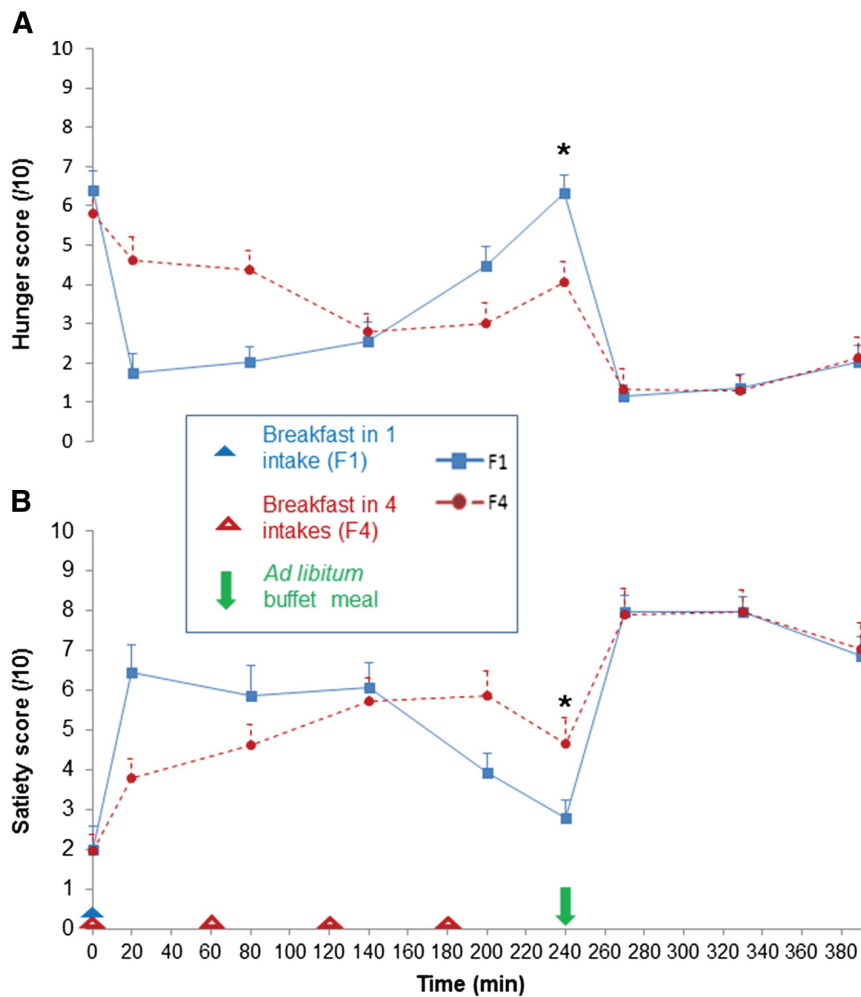


Fig. 1. Hunger and satiety scores between T0 and T390 for the 17 obese subjects. Each value is a 0 to 10 score for hunger (A) and satiety (B). * indicates that $P < 0.05$ where P values are results for the test comparing F1 vs. F4 values at T240.

vs. 31.5 ± 6.5 pg/mL respectively; $P = 0.03$). Also, for F1 the acylated ghrelin concentration at T240 did not differ from T0. But for F4, at T240 the acylated ghrelin concentration was lower, compared to

Table 2

Food intake during the ad libitum buffet lunch for the 17 obese subjects. Total energy intake (in kcal and expressed as % of individual daily energy requirement (DER)), amount of food eaten, energy density of food eaten and macronutrient intakes (in kcal and % of energy intake), energy intake for low energy dense (LED) and high energy dense (HED) food items, for conditions F1 and F4 (mean \pm SEM); P values are results for the test comparing means in F1 condition vs. F4.

| | F1 condition | F4 condition | P |
|--|-----------------|-----------------|-------|
| Total energy intake (kcal) | 1529 \pm 84 | 1460 \pm 94 | 0.30 |
| Total energy intake (% of DER) | 50.5 \pm 2.8 | 47.8 \pm 2.8 | 0.22 |
| Amount of food eaten (g) | 865 \pm 61 | 799 \pm 67 | 0.04* |
| Energy density of food eaten (kcal/g) | 1.82 \pm 0.08 | 1.88 \pm 0.07 | 0.11 |
| Carbohydrate intake (kcal) | 574 \pm 32 | 544 \pm 36 | 0.15 |
| Carbohydrate intake (%) | 37.5 \pm 1.2 | 37.3 \pm 1.0 | 0.58 |
| Lipid intake (kcal) | 670 \pm 47 | 656 \pm 44 | 0.75 |
| Lipid intake (%) | 43.8 \pm 1.0 | 44.9 \pm 0.7 | 0.12 |
| Protein intake (kcal) | 285 \pm 16 | 260 \pm 18 | 0.15 |
| Protein intake (%) | 18.6 \pm 0.6 | 17.8 \pm 0.7 | 0.07 |
| Energy intake from LED food items (kcal) | 624 \pm 40 | 547 \pm 41 | 0.01* |
| Energy intake from HED food items (kcal) | 905 \pm 67 | 913 \pm 68 | 0.80 |

* $P < 0.05$.

baseline ($P = 0.008$). No difference was found for all acylated ghrelin AUCs between conditions.

There was an effect of condition ($P = 0.01$), an effect of time ($P < 0.0001$) and a time \times condition interaction ($P < 0.0001$) for GLP1. At T240, plasma GLP-1 concentration was higher in F4 (4.1 ± 1.1 vs. 3.2 ± 0.8 pmol/L respectively; $P = 0.006$). Also, for F1 the GLP-1 concentration at T240 did not differ from T0. But for F4, at T240 the GLP-1 concentration was higher compared to baseline (4.1 ± 1.1 vs. 2.4 ± 0.8 pmol/L respectively; $P = 0.001$).

GLP-1 AUC for the 0–430 period did not differ between conditions. Nevertheless, GLP-1 AUC for the 0–240 period was lower in F4 (867 ± 202 vs. 1089 ± 187 pmol \cdot L $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$ respectively, $P = 0.002$). GLP-1 AUC for the 240–430 period was higher in F4 (1075 ± 190 vs. 858 ± 143 pmol \cdot L $^{-1}\cdot$ min $^{-1}$ respectively, $P = 0.002$).

3.2. Metabolism

3.2.1. Glucose and insulin (Fig. 3A–B)

Baseline glucose and insulin concentrations did not differ between conditions. Eating-related oscillations were observed following each eating episode. There was an effect of time ($P < 0.001$) and a time \times condition interaction ($P < 0.001$) for both parameters. In F4, just before lunch at T240, plasma glucose concentration (5.6 ± 0.2 vs. 5.2 ± 0.1 mmol/L respectively; $P = 0.03$) and insulin concentration ($21.1 \pm$

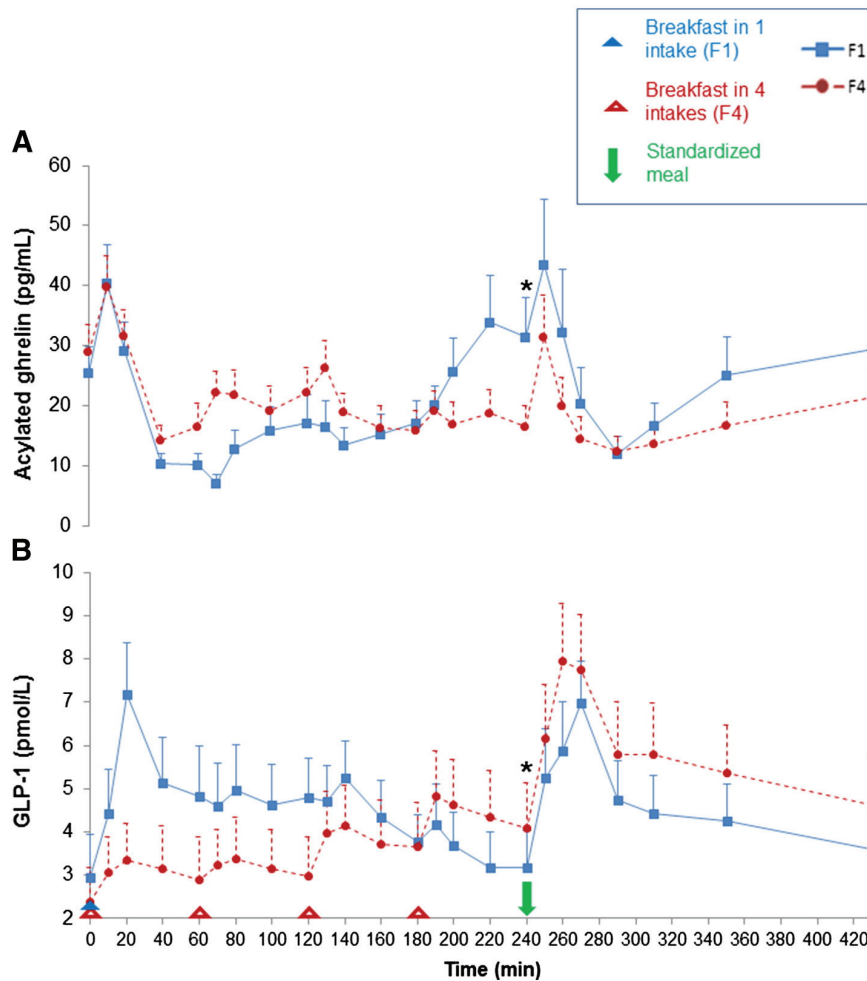


Fig. 2. Kinetics for acylated ghrelin (A) and GLP-1 (B) plasma concentrations between T0 and T430 for the 17 obese subjects. * indicates that $P < 0.05$ where P values are results for the test comparing F1 vs. F4 values at T240.

2.0 vs. 11.2 ± 2.4 mIU/L respectively; $P < 0.0001$) were higher. There was no difference between baseline and T240 glucose concentrations for both conditions. No difference was found for all glucose AUCs between conditions.

Insulin AUC for the 0–430 period was lower in F4 (12759 ± 1021 vs. 14085 ± 1179 mIU·L⁻¹·min⁻¹ respectively, $P = 0.02$). For the 0–240 period, insulin AUC for F4 was lower (6141 ± 525 vs. 7589 ± 659 mIU·L⁻¹·min⁻¹ respectively, $P < 0.0001$). Insulin AUC for the 240–430 period did not differ between conditions.

3.2.2. Non-esterified fatty acids (Fig. 3C)

Baseline NEFA concentrations did not differ between conditions. There was an effect of time ($P < 0.0001$), an effect of condition ($P < 0.0001$) and a time × condition interaction ($P < 0.0001$).

Eating-related decrease of plasma NEFA was observed in F1 and F4. But NEFA concentrations in F4 stayed at a low level for the whole morning. Indeed, F4 plasma NEFA concentration at T240 was lower compared to the baseline (151.4 ± 8.8 vs. 459.8 ± 24.7 μmol/L; $P < 0.001$). Plasma NEFA concentration at T240 was lower in F4 (151.4 ± 8.8 vs. 306.5 ± 30.5 μmol/L; $P < 0.001$).

Total NEFA AUC was lower in F4 (88048 ± 3015 μmol·L⁻¹·min⁻¹ vs. 97264 ± 4112 μmol·L⁻¹·min⁻¹, $P = 0.03$). No difference in NEFA AUC was observed over the 0–240 period, while it was lower over the 240–430 period ($P = 0.001$) in F4.

3.2.3. Energy expenditure

Baseline energy expenditures did not differ between conditions. During the experiment, there was an effect of condition ($P = 0.04$), an effect of time ($P < 0.0001$), and a time × condition interaction ($P = 0.003$), with an increase in IAUC energy expenditure of F1 for the 0–240 period, that was higher compared to F4 ($P = 0.002$), and without any difference for the 240–430 period.

3.2.4. Substrate oxidation

Baseline substrate oxidations did not differ between conditions. There was an effect of time ($P < 0.0001$) and a time × condition interaction ($P < 0.001$) for carbohydrate oxidation that was lower at T240 in F1 compared to F4 ($P < 0.001$). There was an effect of condition ($P = 0.03$) for lipid oxidation that was lower at T240 in F4 ($P = 0.02$).

No difference in substrate oxidation IAUCs was found between the two conditions for the period 0–240. For the 240–430 period, carbohydrate oxidation IAUC for F1 was lower ($P = 0.04$) compared to F4. Nevertheless total IAUC of substrate oxidation did not differ between conditions.

3.2.5. Diet induced thermogenesis

Diet induced thermogenesis for the 0–240 period was lower in F4 (3.6 ± 0.7 vs. $5.2 \pm 0.6\%$ of ECM respectively; $P = 0.03$). There was no difference between conditions for the 240–430 period.

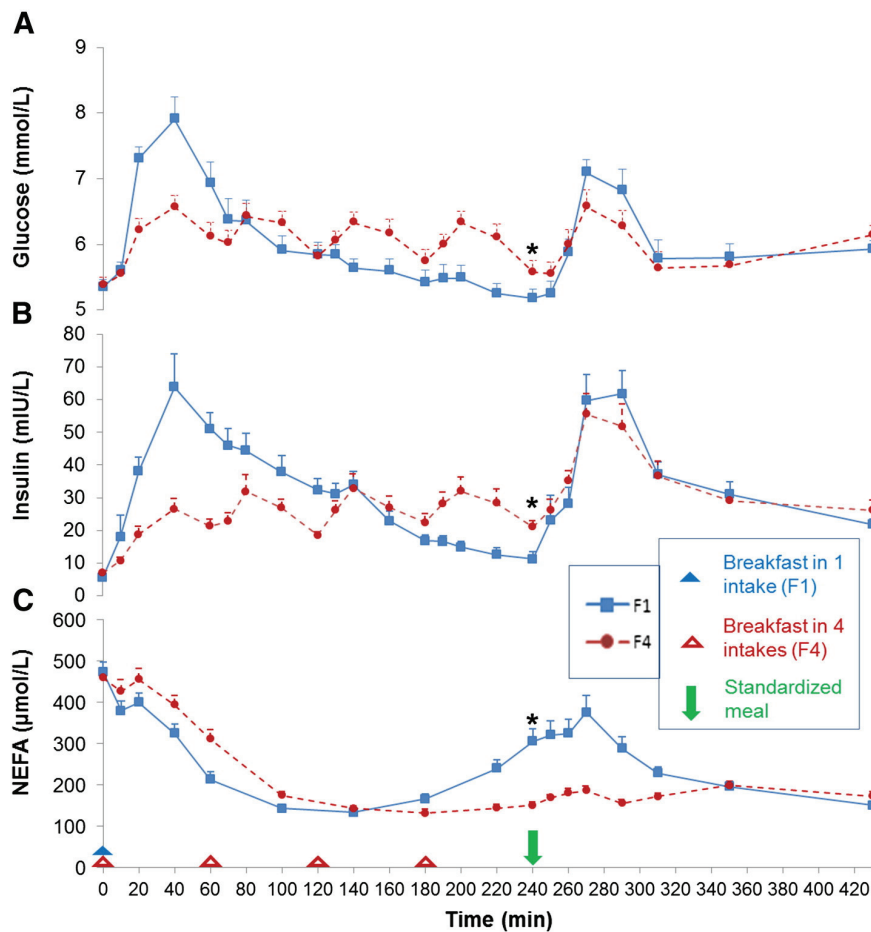


Fig. 3. Kinetics for glucose (A), insulin (B), and NEFA (C) plasma concentrations between T0 and T430 for the 17 obese subjects. * indicates that $P < 0.05$ where P values are results for the test comparing F1 vs. F4 values at T240.

4. Discussion

Despite the beneficial impact on appetite sensations and on ghrelin and GLP-1 concentrations, this study provides evidence that an isocaloric increase of the number of eating episodes does not have a short term positive effect on energy intake in obese men. This shows that, contrary to what we have been able to demonstrate in lean men [11], there is a dissociation between appetite sensation and eating behavior in obese men. Of particular interest, the decrease in appetite was associated with a decrease in food volume intake but not in calories. Moreover, as in lean men we found a decrease in diet induced thermogenesis and lipolysis, reflected by NEFA profiles, that could be deleterious on energy balance in the long run. Overall, there is no advantage to increase eating episodes in obese subjects even in an isocaloric pattern.

4.1. Effect on appetite

We found that having breakfast in four episodes hourly in the morning, compared to having the same breakfast consumed in one episode induced a decrease in hunger just before lunch. This was corroborated by physiological measurements, as ghrelin and GLP-1 were both affected in the sense of decreasing hunger and increasing satiety before the subsequent meal.

Food intake during the subsequent ad libitum meal was decreased in F4 when measured in quantity (grams), but as subjects mainly decreased their intake of LED foods, no difference was found when total energy intake was considered. The absence of a significant effect for

the difference in energy intake between F4 and F1 could be attributed to the small sample size. However, we cannot confirm this assumption, as 7 subjects increased their energy intake in condition F4 while in 10 subjects there was a decrease.

This result challenges the notion that individuals tend to consume similar amounts of food during a meal, which was demonstrated in studies assessing the effect of modifying the fat content or energy density of a meal [29,31]. However, our result is in accordance with the findings of other studies which investigated the effect of different eating designs on subsequent intakes and found no such effect [1,32].

There are a very limited number of experimental studies that have previously assessed the effect of increasing eating frequency on subjective appetite and energy intake in obese subjects. Speechly et al. [32] compared subjective appetite and ad libitum intakes of cottage pie in seven obese males, after having consumed a breakfast in five vs. one episode. After the breakfast in five episodes, they found that subjects were less hungry just before lunch, as in the present study. This decrease in subjective hunger was followed by a decrease in intake in grams, as in our study, but also in total energy, contrary to our findings. The discrepancy for the energy intake between this study and ours may be explained by the methodological considerations concerning the choice of the eating situation. Speechly et al. proposed a single-course meal, while we offered to the subjects a buffet test meal with a large choice. We assume that obese subjects may be able to adjust their intake based on their subjective appetite, under laboratory conditions, without any choice in the availability of food. In an ecological setting, with a wide range of foods available (as in the present study, and as in real life), they

are able to adjust the amount they eat based on their feelings, but they do not seem to be able to adjust the total energy they consume. A recent study of Bachman & Raynor [33] also found that obese subjects instructed to “graze” during a 6-month intervention, reported a decreased level in hunger compared to those who were instructed to eat three times per day. Eating more frequently was thus related to a reduction in hunger, but in this study like ours, in which food availability was not reduced by laboratory constraints, eating frequency was not related to a reduction in energy intake. This highlights the importance of taking care of the choice of the eating situation (test meals, physical surroundings, ambiance) when exploring the impact of parameters of interest on satiety, as previously reported [10,34,35].

The inability of adjusting their energy intake to subjective hunger, after different eating frequency pattern, seems to be obese specific. In a recent study following the same design as the present one, but run with normal weight subjects [11], we demonstrated that a breakfast in four episodes was followed by a decrease in hunger and decreased energy intake, compared to a breakfast in one episode. We assume that obese individuals may be sensitive to the volume but not to the calorie content of food, for adjusting their intake to their hunger.

Regarding biomarkers of appetite, we found in F4, a decreased concentration in acylated ghrelin and an increased concentration in GLP-1 just before the subsequent meal. Our findings are in accordance with two other short term studies that involved normal-weight young adults [11,36]. Despite classical lower levels of ghrelin in obese subjects, the pattern of evolution was remarkably similar to what was observed in lean subjects [11]. Not many eating frequency studies involving obese subjects assessed the effects on biomarkers of appetite. Cameron et al. [37] showed that eating frequency had no effect on ghrelin and PYY profiles in obese subjects, while in another study [5], reduced PYY concentrations were observed with a short term 6 vs. 3 eating-episode pattern. The results of the present study are not in line with the latter. More studies are needed for investigating in more depth the effect of eating frequency on biomarkers of appetite, particularly in obese subjects.

Considering the above, even if increasing eating frequency may help to increase satiety and GLP-1 concentrations and to decrease the level of hunger and ghrelin concentrations, it does not seem to be an adequate strategy for reducing energy intake in obese subjects. Moreover, in real life (i.e. in a non-controlled environment), we can assume that encouraging obese individuals to eat frequently would most likely not produce an isocaloric equivalent of eating three meals per day, as obese individuals are more likely to eat high energy dense foods out of their main meals [38,39] leading to higher energy intake [40]. One limit of the present study is that we only assessed the acute effect of an isocaloric breakfast spread out over time on the food intake at lunch. More ecological studies are needed to study the effect of increasing eating frequency on energy intake in obese subjects over a 24 h period.

4.2. Effect on metabolism

Eating small and frequent meals compared to one large meal had a significant effect on glucose and insulin short-term kinetics in our study. A large breakfast induced sharp glucose and insulin excursions that were absent in the four smaller breakfast episode condition. The AUC for glucose was found to be independent of the condition. In contrast, the insulin AUC decreased when the frequency of eating increased. In response to the same energy intake over the period, less insulin was produced in the high eating frequency condition compared to the low eating frequency condition. This finding is in accordance with a similar study with normal-weight subjects [11] and with most of the previous studies that assessed the short-term effects of different meal frequency on metabolism [5,8,41,44].

As insulin inhibits lipolysis and promotes lipogenesis [45], it has previously been hypothesized that the decrease in plasma insulin associated with increased meal frequency may contribute to decreasing

body fat deposition [46]. Plasma NEFA concentration reflects lipolysis activity [45], and we found a decrease in plasma NEFA AUC when increasing eating frequency. Thus, despite the decrease in total insulin production in F4, the sustained insulin concentration above 20 mIU/L was able to inhibit lipolysis, in agreement with the well-known insulin sensitivity of lipolysis [47]. Considering the above, the loss of an inter-prandial fast, characterized by the maintenance of insulin concentrations above baseline induced by the increase in eating frequency, could in the long term contribute to a resistance to weight loss. The return to baseline concentration for insulin seems to play a key role in orientating the body to a lipolysis pattern. A longer term design would be necessary in order to confirm this hypothesis.

Insulin also regulates the oxidation ratio between carbohydrate and lipid oxidation [45]. As in a recent study [8], we were not able to highlight differences in total lipid oxidation. This suggests that the differences in insulin concentrations reached in both experiments were not sufficient to induce different inhibitions of lipid oxidation. This finding attempts to moderate the speculation around the possible influence of eating frequency on fat mass.

In the present study, increasing eating frequency induced a decrease in DIT, as already observed in similar conditions with normal weight subjects [11], and in other eating frequency studies [8,13]. However, other authors found no effect of eating frequency on DIT [3,48,49], or an opposite effect [12]. Even if the negative effect of increasing meal frequency on DIT was minor in the present study, this should be taken into account considering a longer run perspective.

Overall, the effect of increasing eating frequency on metabolism is debatable: a higher number of eating episodes decreased the global insulin response which could be seen as favorable, but on the contrary, the loss of the inter-prandial fast was associated with an inhibition of lipolysis and DIT, that could in the long run have an adverse effect on body weight.

5. Conclusion

The present study does not support the hypothesis that an isocaloric increase in eating frequency may help reduce energy intake in obese individuals, even if a decrease in hunger has been observed. We assume that obese individuals are able to adjust the volume, but not the energy content of their intake in relation to their hunger levels after different eating frequency patterns. Metabolic parameters were affected by a higher number of eating episodes in the sense of inhibiting lipolysis activity and decreasing diet induced thermogenesis. Considering the above, eating smaller and more frequent meals should not be considered as an adequate strategy to promote weight loss in obese individuals.

Acknowledgments

This study was supported by the Fondation Nestlé France and Thermes de Brides Les Bains. We thank Agnes Giboreau, research director of the Institut Paul Bocuse Research Centre for her support at each step of the study. We are also grateful for the contribution from the members of the Institut Paul Bocuse and of the Rhône-Alpes Research Centre for Human Nutrition.

References

- [1] Speechly DP, Buffenstein R. Greater appetite control associated with an increased frequency of eating in lean males. *Appetite* 1999;33:285–97.
- [2] Leahy FE, Jebb SA, Moore MS, Prentice AM. Effect of meal frequency and exercise on subsequent energy intake in lean men. *Int J Obes (Lond)* 2000;24(Suppl. 1):S15.
- [3] Smeets AJ, Westerterp-Plantenga MS. Acute effects on metabolism and appetite profile of one meal difference in the lower range of meal frequency. *Br J Nutr* 2008;99:1316–21.
- [4] Taylor MA, Garrow JS. Compared with nibbling, neither gorging nor a morning fast affect short-term energy balance in obese patients in a chamber calorimeter. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:519–28.

- [5] Leidy HJ, Armstrong CL, Tang M, Mattes RD, Campbell WW. The influence of higher protein intake and greater eating frequency on appetite control in overweight and obese men. *Obesity* 2010;18:1725–32.
- [6] de Graaf C, Blom WA, Smeets PA, Stafleu A, Hendriks HF. Biomarkers of satiety and satiety. *Am J Clin Nutr* 2004;79:946–61.
- [7] Lemmens SG, Martens EA, Kester AD, Westerterp-Plantenga MS. Changes in gut hormone and glucose concentrations in relation to hunger and fullness. *Am J Clin Nutr* 2011;94:717–25.
- [8] Munsters MJM, Saris WHM. Effects of meal frequency on metabolic profiles and substrate partitioning in lean healthy males. *PLoS One* 2012;7:e38632.
- [9] Solomon TP, Chambers ES, Jeukendrup AE, Toogood AA, Blannin AK. The effect of feeding frequency on insulin and ghrelin responses in human subjects. *Br J Nutr* 2008;100:810–9.
- [10] Alliro X, Saulais S, Disse E, Nazare JA, Cazal C, Laville M. Integrating behavioral measurements in physiological approaches of satiety. *Food Qual Prefer* 2014;31:181–9.
- [11] Alliro X, Saulais L, Seyssel K, Roth H, Charrié A, Drai J, et al. An isocaloric increase of eating episodes in the morning contributes to decrease energy intake at lunch in lean men. *Physiol Behav* 2013;110–111:169–78.
- [12] LeBlanc J, Mercier I, Nadeau A. Components of postprandial thermogenesis in relation to meal frequency in humans. *Can J Physiol Pharmacol* 1993;71:879–83.
- [13] Tai MM, Castillo P, Pi-Sunyer FX. Meal size and frequency: effect on the thermic effect of food. *Am J Clin Nutr* 1991;54:783–7.
- [14] Mehra R, Tsalikian E, Chenard CA, Zimmerman MB, Sivitz WI. Feeding frequency and appetite in lean and obese prepubertal children. *Obesity* 2010;19:560–7.
- [15] Palmer MA, Capra S, Baines SK. Association between eating frequency, weight, and health. *Nutr Rev* 2009;67:379–90.
- [16] Van Strien T, Frijters J, Bergers G, Defares P. The Dutch Eating Behavior Questionnaire (DEBQ) for assessment of restrained, emotional, and external eating behavior. *Int J Eat Disord* 1986;5:295–315.
- [17] Lluch A, Kahn J, Stricker-Krongrad A, Ziegler O, Drouin P, Mejean L. Internal validation of a French version of the Dutch eating behaviour questionnaire. *Eur Psychiatry* 1996;11:198–203.
- [18] Stunkard AJ, Messick S. The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. *J Psychosom Res* 1985;29:71–83.
- [19] Lluch A. Identification des conduites alimentaires par approches nutritionnelles et psychométriques: implications thérapeutiques et préventives dans l'obésité humaine. Nancy: University Henri Poincaré, Nancy 1; 1995.
- [20] Giboreau A, Fleury H. A new research platform to contribute to the pleasure of eating and healthy food behaviors through academic and applied food and hospitality research. *Food Qual Prefer* 2009;20:533–6.
- [21] Alliro X, Saulais L, Disse E, Roth H, Cazal C, Laville M. Validation of a buffet meal design in an experimental restaurant. *Appetite* 2012;58:889–97.
- [22] Almiron-Roig E, Green H, Virgili R, Aeschlimann JM, Moser M, Erkner A. Validation of a new hand-held electronic appetite rating system against the pen and paper method. *Appetite* 2009;53:465–8.
- [23] Roseblum J, Stein HK. Medical treatment of obesity. In: Farraye F, Forse R, editors. *Bariatric surgery: a primer for your medical practice*. Thorofare NJ: Slack Incorporated; 2006. p. 21–43.
- [24] Blond E, Maitrepierre C, Normand S, Sothier M, Roth H, Goudable J, et al. A new indirect calorimeter is accurate and reliable for measuring basal energy expenditure, thermic effect of food and substrate oxidation in obese and healthy subjects. *E Spen Eur E J Clin Nutr Metab* 2011;6:e7-15.
- [25] Ferrannini E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism* 1988;37:287–301.
- [26] Arock M, Desnault H, Viars P, Guillosson JJ. Determination of total nitrogen in biological milieux by chemoluminescence: a comparison with the reference method. *Ann Biol Clin (Paris)* 1985;43:872–4.
- [27] Yeh KC, Kwan KC. A comparison of numerical integrating algorithms by trapezoidal, Lagrange, and spline approximation. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978;6:79–98.
- [28] Nazare JA, Sauvignet V, Normand S, Guerin-Deremaux L, Gabert L, Desage M, et al. Impact of a resistant dextrin with a prolonged oxidation pattern on day-long ghrelin profile. *J Am Coll Nutr* 2011;30:63–72.
- [29] Stubbs RJ, Harbron CG, Murgatroyd PR, Prentice AM. Covert manipulation of dietary fat and energy density: effect on substrate flux and food intake in men eating ad libitum. *Am J Clin Nutr* 1995;62:316–29.
- [30] Bell EA, Castellanos VH, Pelkman CL, Thorwart ML, Rolls BJ. Energy density of foods affects energy intake in normal-weight women. *Am J Clin Nutr* 1998;67:412–20.
- [31] Rolls BJ, Miller DL. Is the low-fat message giving people a license to eat more? *J Am Coll Nutr* 1997;16:535–43.
- [32] Speechly DP, Rogers GG, Buffenstein R. Acute appetite reduction associated with an increased frequency of eating in obese males. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:1151–9.
- [33] Bachman JL, Raynor HA. Effects of manipulating eating frequency during a behavioral weight loss intervention: a pilot randomized controlled trial. *Obesity* 2012;20:985–92.
- [34] Meiselman HL. Environmental factors in eating and obesity. *Appetite* 2006;47:270.
- [35] Larson N, Story M. A review of environmental influences on food choices. *Ann Behav Med* 2009;38(Suppl. 1):S56–73.
- [36] Lemmens SG, Martens EA, Born JM, Martens MJ, Westerterp-Plantenga MS. Staggered meal consumption facilitates appetite control without affecting postprandial energy intake. *J Nutr* 2011;141:482–8.
- [37] Cameron JD, Cyr MJ, Doucet E. Increased meal frequency does not promote greater weight loss in subjects who were prescribed an 8-week equi-energetic energy-restricted diet. *Br J Nutr* 2010;103:1098–101.
- [38] Muñoz-Pareja M, Guallar-Castillon P, Mesas AE, Lopez-Garcia E, Rodriguez-Artalejo F. Obesity-related eating behaviors are associated with higher food energy density and higher consumption of sugary and alcoholic beverages: a cross-sectional study. *PLoS One* 2013;8:e77137.
- [39] de Graaf C. Effects of snacks on energy intake: an evolutionary perspective. *Appetite* 2006;47:18–23.
- [40] Perez-Escamilla R, Obbagy JE, Altman JM, Essery EV, McGrane MM, Wong YP, et al. Dietary energy density and body weight in adults and children: a systematic review. *J Acad Nutr Diet* 2012;112:671–84.
- [41] Jenkins DJ, Wolever TM, Ocana AM, Vuksan V, Cunnane SC, Jenkins M, et al. Metabolic effects of reducing rate of glucose ingestion by single bolus versus continuous sipping. *Diabetes* 1990;39:775–81.
- [42] Wolever TM. Metabolic effects of continuous feeding. *Metabolism* 1990;39:947–51.
- [43] Jones PJ, Leitch CA, Pederson RA. Meal-frequency effects on plasma hormone concentrations and cholesterol synthesis in humans. *Am J Clin Nutr* 1993;57:868–74.
- [44] Jenkins DJ, Wolever TM, Vuksan V, Brighenti F, Cunnane SC, Rao AV, et al. Nibbling versus gorging: metabolic advantages of increased meal frequency. *N Engl J Med* 1989;321:929–34.
- [45] Dimitriadis G, Mitron P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;93(Suppl. 1):S52–9.
- [46] Ma Y, Bertone ER, Stanek III EJ, Reed GW, Hebert JR, Cohen NL, et al. Association between eating patterns and obesity in a free-living US adult population. *Am J Epidemiol* 2003;158:85–92.
- [47] Jensen MD, Caruso M, Heiling V, Miles JM. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* 1989;38:1595–601.
- [48] Bellisle F, McDevitt R, Prentice AM. Meal frequency and energy balance. *Br J Nutr* 1997;77(Suppl. 1):S57–70.
- [49] Kinabo JL, Durnin JV. Effect of meal frequency on the thermic effect of food in women. *Eur J Clin Nutr* 1990;44:389–95.