



HAL
open science

Impact de l'acide octanoïque alimentaire sur l'octanoylation de la Ghréline, chez le rat

Fanny Lemarie

► **To cite this version:**

Fanny Lemarie. Impact de l'acide octanoïque alimentaire sur l'octanoylation de la Ghréline, chez le rat. Biochimie, Biologie Moléculaire. Agrocampus Ouest, 2016. Français. NNT : 2016NSARI075 . tel-01730643

HAL Id: tel-01730643

<https://theses.hal.science/tel-01730643>

Submitted on 13 Mar 2018

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.

UNIVERSITE

BRETAGNE

LOIRE

AGRO
CAMPUS

OUEST

FANNY LEMARIÉ • 29 mars 2016

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université européenne de Bretagne
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Biochimie - Biologie moléculaire et cellulaire

ÉCOLE DOCTORALE • Vie - Agro - Santé (VAS)
LABORATOIRE D'ACCUEIL • Biochimie

**Impact de l'acide
octanoïque alimentaire sur
l'octanoylation de la Ghréline,
chez le rat**

Frédéric CARRIÈRE

Directeur de recherche, CNRS Marseille / *président*

Virginie TOLLE

Chargée de recherche, INSERM Paris / *rapporteuse*

Michel NARCE

Professeur, Université de Bourgogne / *rapporteur*

Philippe LEGRAND

Professeur, AGROCAMPUS OUEST / *examineur*

Corinne MARMONIER

PhD, Cheffe de service CNIEL / *examinatrice*

Vincent RIOUX

Professeur, AGROCAMPUS OUEST / *directeur de thèse*

Remerciements

A tous ceux que je vais oublier dans les prochaines lignes : « Merci ! ».

Je remercie, en premier lieu, le Professeur Philippe Legrand de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine et pour avoir participé à ma maturation scientifique.

Je remercie ensuite le Professeur Vincent Rioux, sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour, pour m'avoir fait confiance en m'acceptant comme doctorante. Je le remercie également pour sa grande disponibilité et pour m'avoir guidée dans ce travail, en me faisant profiter de son expérience et de ses compétences. Un grand merci pour m'avoir transmis la passion de l'acylation !

Je remercie le Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière (CNIEL) qui a supporté financièrement ce travail, plus particulièrement Corinne Marmonier (chef du Service Recherche Nutrition) et Constance Boyer (chef de Projet Recherche Nutrition).

Je remercie les membres du jury évaluant cette thèse : Merci au Docteur Virginie Tolle et au Professeur Michel Narce, qui ont accepté d'examiner et de juger ce travail en tant que rapporteurs, qu'ils trouvent ici l'expression de toute ma gratitude. Merci au Docteur Frédéric Carrière, pour avoir accepté de présider le jury. Merci à nouveau à Corinne Marmonier d'avoir accepté d'être examinatrice de ce travail.

Je remercie une nouvelle fois le Docteur Frédéric Carrière ainsi que le Docteur Jean-François Cavalier et Vanessa Point, du Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse (EIPL UMR7282 CNRS, Marseille, France), pour le travail fructueux de collaboration sur l'inhibition de la lipase préduodénale de rat.

Merci à Stéphanie Dayot, stagiaire de M2 pendant ma thèse, qui a contribué à ce travail. Un grand merci pour ton travail et pour avoir égayé les journées, au labo ou en dehors. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la thèse que tu réalises en ce moment !

Je remercie le Docteur Claire Bourlieu (STLO, Rennes) pour sa participation au comité de thèse, ses conseils scientifiques, son aide pour l'analyse des acides gras libres et également pour sa gentillesse. Je remercie également Samira Cassia de Oliveira, pour m'avoir aidée à ne pas me perdre au STLO et pour sa prévenance.

Je remercie Julien Jardin et les autres membres de la plateforme d'analyse protéomique du laboratoire Science et Technologie du Lait et de l'œuf (STLO, Rennes) pour les analyses en LC-MS/MS.

Je remercie le Docteur Alain Fautrel et les autres membres de la plateforme d'histopathologie H2P2 (Histo-Pathology High Precision) de l'Université de Rennes 1 (Biosit), pour leur expertise, leur aide technique.

Je tiens à remercier vivement mes autres collègues du laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine, d'Agrocampus Ouest :

Merci à Frédérique Pédrone pour ses conseils, son soutien et ses histoires rigolotes aux pauses café (tirés ou non de la rubrique faits divers).

Merci à Erwan Beauchamp, pour son encadrement en début de thèse, même s'il a ensuite dû partir pour les contrées lointaines canadiennes afin de poursuivre un joli projet de recherche.

Merci à Cyrielle Garcia, pour ses conseils, son implication dans les expérimentations, sa bonne humeur et sa gentillesse et son amitié.

Merci à Daniel Catheline pour avoir pris le temps de répondre à mes nombreuses questions sans (trop) perdre patience et pour sa gentillesse (la majorité du temps !).

Merci à Françoise Boissel qui a été à mi-chemin entre une mère et une amie et qui a été une collègue géniale ! Merci pour les heures supp' faites pour m'aider, pour ta motivation et ton énergie intarissable.

Merci à Nathalie Boulier-Monthéan, la technicienne « number one » ! J'ai été ravie de parler tricot, couture, articles du nouvelle obs', cuisine (mi-cuit), Hearthstone, jardinage, musique, film ... et même, quelques fois, boulot.

Merci à Cécile Duby pour son aide technique et informatique.

Merci à Josette qui restera, pour moi, la secrétaire « number one ».

Merci à Justine Marchix, ma colloc' de bureau dont le rire a illuminé mes journées. Les bons moments passés ensemble au labo ou en dehors... à écouter en boucle les Deschiens, Nicole Ferroni ou la musique du Hobbit... à boire des verres à l'Amaryllis ou au Knock... à faire des soirées Tupperware... ont embelli ces trois années.

Merci aux autres doctorants et stagiaires: Benjamin Choque, Anaëlle Siquin, Charlène Alain, Etienne Guillocheau et Gaëtan Drouin... Je leur souhaite bonne chance pour mener à bien leur projet.

Merci à Morgane Boutin et Pierre-François Roux, les amis de génét'.

Un grand merci à mes ami(e)s de prépa, de l'agro, de Risques & Périls ou d'ailleurs... Petite mention spéciale à Tiphaine, Clem, Diane, Clarisse qui ont joué un grand rôle.

Merci à mes parents, qui m'ont donnée la possibilité de faire de longues études, qui m'ont transmise le goût des sciences et qui me soutiennent en toutes situations. Merci à ma sœur Caroline, à Sylvain et à leur petit Léo, né au cours de ce doctorat. Merci aux autres membres de ma famille, ma grand-mère, mes cousines et cousins,

Merci Sylvie, pour la relecture consciencieuse de cette thèse, à la recherche de la moindre faute d'orthographe. Merci aussi pour plein d'autres choses en générale, tu es une super « belle-maman » !

Un dernier merci mais pas des moindres... Merci mon Hyacinthe, d'avoir été là pour me faire rire et me faire oublier la recherche et la ghréline quand j'en avais besoin. Ton amour a été une composante essentielle dans la réalisation de cette thèse et dans ma vie. En recherche, il y a parfois des jours sans, mais tant que je peux te retrouver le soir, tout ira bien.

Une dernière petite pensée pour Diglett, Bidouf, Missouri et Octarine, nos 4 rats domestiques qui se sont succédé pendant ces 3 ans...

Table des matières

Liste des abréviations	13
Nomenclature des acides gras	17
<i>Avant-propos</i>	19
<i>Synthèse bibliographique</i>	23
1. Métabolisme des AGCM : synthèse, digestion, absorption et utilisation cellulaire	24
1.1. Définition des AGCM	24
1.2. Origines endogène et alimentaire des AGCM	25
1.2.1. Synthèse <i>de novo</i> des AGCM	25
1.2.2. Sources alimentaires naturelles et synthétiques des AGCM	26
1.2.3. Apport en AGCM dans l'alimentation et apports nutritionnels conseillés	27
1.3. Digestion des AGCM, comparés aux AGCL	27
1.3.1. Émulsification des lipides	27
1.3.2. Lipolyse des AGCM estérifiés par les lipases digestives	28
1.3.2.1. Rôles des lipases digestives gastro-intestinales	28
1.3.2.2. Lipases préduodénales et libération précoce des AGCM	28
1.3.2.2.1. Origines des lipases préduodénales	28
1.3.2.2.2. Lipolyse des AGCM estérifiés par les lipases préduodénales	29
1.3.2.2.2.1. Spécificités des lipases préduodénales	29
1.3.2.2.2.2. Importance physiologique des lipases préduodénales	30
1.3.2.2.2.3. Contribution à la lipolyse totale	31
1.3.2.3. Rôle de la lipase pancréatique	32
1.3.2.4. Inhibiteurs de lipases	33
1.3.3. Absorption des AGCM dans le tractus-digestif	33
1.4. Utilisation cellulaire des AGCM dans le foie	34
1.4.1. Entrée des AGCM dans la matrice mitochondriale	34
1.4.2. Activation des AGCM en acyl-CoA par les ACSM	34
1.4.3. β -oxydation mitochondriale des AGCM	35
1.4.4. Autres voies cataboliques des AGCM	35
1.5. Utilisation cellulaire des AGCM dans les tissus périphériques	36
2. Effets physiologiques et intérêts thérapeutiques des AGCM	36

2.1. Effets des AGCM sur certains paramètres plasmatiques	37
2.1.1. Effets sur la lipidémie plasmatique	37
2.1.2. Effets sur l'homéostasie du glucose	38
2.2. Effets des AGCM sur l'homéostasie énergétique	39
2.2.1. Effets sur le stockage des lipides et la prise de poids	39
2.2.2. Effets sur la satiété et la prise alimentaire	40
2.3. Propriétés des AGCM sur l'immunologie	41
2.3.1. Effets sur l'inflammation chronique	41
2.3.2. Propriétés antivirales et antibactériennes	42
2.4. Effets des AGCM alimentaires sur la disponibilité cellulaire en AGPI	43
2.5. Exemples d'utilisations thérapeutiques des AGCM	44
2.5.1. Intérêts dans le cas de pathologies nutritionnelles	44
2.5.2. Intérêts dans d'autres pathologies	44
2.5.3. Effets secondaires d'un excès d'AGCM	45
3. Octanoylation de la ghréline : effets et régulations	45
3.1. L'acylation des protéines	46
3.1.1. Généralités sur les modifications de protéines par des lipides	46
3.1.2. Acylation des protéines par des acides gras saturés	47
3.2. Fonctionnement de l'axe ghréline-GOAT-GHSR-1a	48
3.2.1. Découverte de la ghréline	48
3.2.1.1. Identification d'un récepteur orphelin secretagogue de la GH	48
3.2.1.2. Identification du ligand endogène du récepteur GHSR-1a	48
3.2.2. Du gène <i>Ghrl</i> à la synthèse de la ghréline et des peptides dérivés	49
3.2.2.1. Le gène <i>Ghrl</i> code pour une préprohormone, la préproghréline	49
3.2.2.2. Les différents peptides encodés par le gène <i>Ghrl</i>	50
3.2.2.3. Expression de la ghréline et des peptides dérivés dans les tissus	50
3.2.2.3.1. Expression dans les cellules « ghréline » de l'estomac et l'intestin	50
3.2.2.3.2. Expression dans d'autres tissus	51
3.2.3. Octanoylation de la ghréline par la GOAT et sécrétion dans le plasma	52
3.2.3.1. La GOAT catalyse l'acylation de la ghréline	52
3.2.3.2. Maturation de la ghréline dans les cellules de l'estomac	53
3.2.3.3. Sécrétion de la ghréline octanoylée et non acylée dans le plasma	54
3.2.3.4. Cycle de sécrétion de la ghréline dans le plasma	55
3.2.4. Activation de GHSR-1a par la ghréline octanoylée	55
3.2.4.1. Structure et expression du récepteur GHSR-1a	55

3.2.4.2. Fixation de la ghréline acylée sur le récepteur GHSR-1a	56
3.3. Effets physiologiques de la ghréline octanoylée	56
3.3.1. Effets via la sécrétion de GH.....	57
3.3.2. Effet sur l'homéostasie énergétique	57
3.3.2.1. Effet orexigène	57
3.3.2.2. Effet sur la masse corporelle et l'adiposité	59
3.3.3. Effet sur l'homéostasie du glucose et sur la résistance à l'insuline	59
3.3.4. Effet sur l'inflammation.....	60
3.3.5. Effets sur la tension artérielle et le fonctionnement cardiaque	61
3.3.6. Autres effets de la ghréline	61
Conclusion de la synthèse bibliographique.....	62
<i>Résultats et discussions</i>	67
A. Effets de la consommation chronique d'acide octanoïque à différentes doses sur l'axe ghréline-GOAT et sur le métabolisme lipidique.....	68
A.1. Effets de la consommation chronique de C8:0 à différentes doses sur la régulation de l'axe ghréline-GOAT	69
A.1.1. Contexte et présentation de l'étude.....	69
A.1.2. Article 1	72
Abstract	73
Introduction.....	74
Materials and methods	76
Chemicals.....	76
Diets.....	76
Animals	77
Measurement of the plasma acylated and unacylated ghrelin.....	78
Analysis of the other plasma parameters	78
Lipid extraction and FA analysis	79
Quantification of mRNA expression by Real-Time PCR.....	79
Determination of adipocyte size (morphometric analysis).....	80
Immunohistochemistry	80
Statistical analysis.....	80
Results	81
C8:0 availability in the stomach, intestine and other tissues.....	81
Plasma acylated and unacylated ghrelin.....	82
Stomach PPG mRNA level and ghrelin peptide expression.....	83

Analysis of parameters putatively controlled by plasma ghrelin	83
Discussion	84
Acknowledgments	91
A.2. Résultats complémentaires.....	92
A.2.1. Matériels et méthodes.....	92
A.2.1.1. Extraction des lipides et analyse de la composition en acides gras des tissus	92
A.2.1.2. Dosage pondéral des lipides du foie	92
A.2.1.3. Activité de l'enzyme malique du foie.....	92
A.2.1.3.1. Préparation des fractions cytosoliques de foie.....	92
A.2.1.3.2. Mesure de l'activité de l'enzyme malique	93
A.2.1.4. Mesure des transcrits (ARNm) par PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq).....	93
A.2.1.4. Mesure de l'adiposité dans le tissu adipeux mésentérique.....	93
A.2.1.5. Analyses statistiques	94
A.2.3. Résultats.....	94
A.2.3.1. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en AG du cerveau, du cœur et du muscle gastrocnémien	94
A.2.3.2. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur le métabolisme lipidique dans le foie.....	95
A.2.3.3. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur les TA épидидymal, sous-cutané et mésentérique	96
A.2.4. Discussion.....	97
A.2.4.1. Effets de la dose de trioctanoïne sur la composition en AG dans le cerveau, le cœur et le muscle gastrocnémien.....	97
A.2.4.1. Effets de la dose de Tri-C8:0 sur le métabolisme lipidique du foie.....	99
A.2.4.1. Effets de la dose de Tri-C8:0 sur le métabolisme lipidique dans les TA.....	101
Conclusion de la partie A.....	102
B. Démonstration de l'absorption gastrique du C8:0, ingéré sous forme de Tri-C8:0, par inhibition de la lipase préduodénale	103
B.1. Contexte et objectifs de l'étude.....	104
B.2. Article 2	106
Abstract	107
Introduction.....	108
Materials and Methods	110
Chemicals.....	110
Sources of enzymes for <i>in vitro</i> lipase inhibition.....	110
Lipid emulsions composition	111
Animals	112

Lipid extraction and FA analysis	112
Measure of the enrichment in carbon 13	113
Measure of acylated and unacylated ghrelin in plasma.....	114
Lipase activity measurements	114
In vitro lipase inhibition by BemPPOX.....	114
Statistical analysis.....	115
RESULTS.....	116
<i>In vitro</i> selective inhibition of rat preduodenal lipase by BemPPOX.....	116
Preduodenal lipase inhibition significantly decreases C8:0 content in the stomach mucosa	116
Preduodenal lipase inhibition significantly prevents ¹³ C-C8:0 gastric absorption from (1,1,1- ¹³ C)-Tri-C8:0 emulsion	118
Preduodenal lipase inhibition also impairs duodenal total FA absorption	118
Preduodenal lipase inhibition and subsequent decrease of C8:0 gastric absorption have no effect on plasma octanoylated ghrelin concentration.....	119
Discussion	120
Conclusion	125
Acknowledgments	125
C. Étude préliminaire <i>in vitro</i> du métabolisme du C8:0 dans les cellules gastriques.....	126
C.1. Contexte et objectifs de l'étude	127
C.2. Matériels et méthodes	127
C.2.1. Animaux.....	127
C.2.2. Cultures cellulaires	128
C.2.2.1. Culture d'hépatocytes de rat en culture primaire	128
C.2.2.2. Culture primaire des cellules d'estomac de raton	129
C.2.3. Incubations des cellules avec des acides gras	131
C.2.3.1. Préparation des complexes albuminiques d'acides gras	131
o Principe général de la complexation.....	131
o Cas particulier des AGCM.....	131
C.2.3.2. Préparation de milieux contenant des acides gras non complexés à l'albumine	132
C.2.3.3. Incubation	132
C.2.3.4. Collecte des cellules et des milieux de culture.....	132
C.2.3.5. Dosage des protéines totales	132
C.2.4. Mesure de l'incorporation des acides gras (radiomarqués ou non) dans les cellules, les lipides et les produits de β-oxydation	133
C.2.4.1. Extraction des lipides	133

○ Acides gras non radiomarqués ou marqués au carbone 13	133
○ Acides gras radiomarqués au carbone 14	133
C.2.4.2. Mesure de la radioactivité incorporée dans les produits de β -oxydation	133
○ Mesure de la production de $^{14}\text{CO}_2$	133
○ Mesure de la production de métabolites acido-solubles radioactifs.....	134
C.2.5. Click chemistry ou azido/alcyne cyclo-addition de Huisgen, en catalyse cuivrique	134
C.2.5.1. Synthèse de l'alcyne-C8:0	134
C.2.5.2. Préparation des milieux contenant les alcynes.....	135
C.2.5.3. Incubation des cellules avec les milieux contenant les alcynes	135
C.2.5.4. Collecte des cellules	135
C.2.5.5. Incubation avec des billes de NeutrAvidine	136
C.2.5.6. Réaction de click chemistry.....	136
C.2.6. Immunofluorescence	136
C.2. Résultats	137
C.2.1. Métabolisme du C8:0 dans les cellules d'estomac, comparé au métabolisme du C8:0 dans les hépatocytes.....	137
• Métabolisme du C8:0 dans les hépatocytes	137
• Métabolisme de l'acide octanoïque dans la muqueuse gastrique	138
C.2.2. Utilisation du C8:0 pour l'acylation de la ghréline dans les cellules d'estomac en culture primaire	139
C.3. Discussion.....	141
Conclusion de la partie C.....	143
D. Mise en place de l'étude de la ghréline O-acyltransférase de rat (rGOAT): résultats préliminaires	144
D.2. Matériels et méthodes.....	145
D.2.1. Constructions plasmidiques	145
D.2.1.1. Clonage des ADN codant pour la GOAT, la préproghréline (PPG) et la ghréline de rat dans des plasmides d'expression	145
D.2.1.2. Obtention des plasmides en grande quantité	146
D.2.2. Expression des protéines recombinantes d'intérêt dans des cellules eucaryotes de mammifères	147
D.2.2.1. Culture de lignées cellulaires	147
D.2.2.2. Transfection transitoire par électroporation ou par des agents commerciaux.....	147
D.2.3. Expression des protéines recombinantes d'intérêt dans des cellules eucaryotes d'insectes	148
D.2.3.1. Culture des cellules Sf9	148

D.2.3.2. Constructions des bacmides	148
D.2.4. Collecte des cellules et analyse des protéines par Western blot	149
D.2.5. Mesure de l'activité de la GOAT de rat	150
D.3. Résultats.....	151
D.3.1. Tentatives multiples d'expression de la GOAT recombinante de rat dans des cellules eucaryotes de mammifères.....	151
D.3.2. Expression de la GOAT recombinante de rat dans des cellules d'insectes.....	152
D.3.3. Mesure <i>in vitro</i> de l'activité de la GOAT recombinante de rat	153
D.4. Discussion et perspectives	155
Discussion générale, perspectives et conclusion	158
Références.....	168
Annexe 1.....	194
Annexe 2 et 3.....	195

Index des Figures

Figure 1. Synthèse <i>de novo</i> des AGCM dans la glande mammaire en lactation	25
Figure 2. Digestion et absorption des AGCM, comparé aux AGCL.....	28
Figure 3. Voies cataboliques des acides gras, selon la longueur de chaîne	35
Figure 4. Effets physiologiques des AGCM selon l'organe et la dose consommée	36
Figure 5. Protection contre la β -oxydation des précurseurs alimentaires et de leurs dérivés par la matière grasse laitière	43
Figure 6. Augmentation de l'activité des désaturases par la matrice grasse laitière	43
Figure 7. Classification des différents types d'acylations de protéines	46
Figure 8. Sécrétion de GH déclenchée par le récepteur GHRH-R	47
Figure 9. Sécrétion de GH déclenchée par le récepteur orphelin GHSR	48
Figure 10. Structure du gène <i>Ghrl</i> codant pour la ghréline et ses dérivés	49
Figure 11. Structure de l'estomac humain (couches de cellules et régions)	50
Figure 12. Structure de l'estomac de rat (régions)	50
Figure 13. Crypte, glandes gastriques et principaux types cellulaires	51
Figure 14. Structure de la ghréline O-acyltransférase (GOAT ou MBOAT4)	52
Figure 15. Maturation de la ghréline et octanoylation post-traductionnelle	53
Figure 16. Régulation des îlots de Langerhans par la ghréline acylée	60
Figure 17. Fonctions régulées par la ghréline	62
Figure 18. Représentation schématique des différents groupes de rats et conditions	69
Figure 19. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur la masse des lipides totaux (LT) dans le foie des rats des groupes MF, HF et CR	96
Figure 20. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur l'activité spécifique de l'enzyme malique et sur l'expression des ARNm de l'enzyme FAS	98
Figure 21. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la distribution des adipocytes du TA mésentérique dans les groupes MF, selon leur diamètre	102
Figure 22. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur l'expression des ARNm d'IL-6 et TNF- α dans le TA mésentérique	102
Figure 23. Culture primaire de cellules d'estomac de rats	130
Figure 24. Principe de la click Chemistry (exemple avec de l'alcyne-C14:0)	134
Figure 25. Synthèse de l'alcyne-C8:0 et caractérisation en GC-MS	135
Figure 26. Mesure de la radioactivité dans les milieux de culture et les lysats cellulaires d'hépatocytes après incubation avec du 14 C-C8:0 ou du 14 C-C14:0	136
Figure 27. Incubation d'hépatocytes avec des milieux contenant des complexes albuminiques de C8:0	138
Figure 28. Mesure de la radioactivité dans les milieux de culture et les lysats cellulaires de cellules gastriques après incubation avec des complexes albuminiques de 14 C-C8:0	139
Figure 29. Détection de protéines octanoylées dans les cellules d'estomac de rats en culture primaire, par la technique de click chemistry	140
Figure 30. Séquences d'ADN codant pour la ghréline O-acyltransférase (NM_001107317.2) et la préproghréline (NM_021669) de rat obtenues dans la banque de données NCBI	146
Figure 31. Clonage de la séquence d'ADN codant pour la GOAT de rat dans le plasmide pcDNA3.	147
Figure 32. Représentation schématique des différentes étapes permettant l'expression d'une	

protéine recombinante dans des cellules d'insectes en utilisant le kit « Bac-to-Bac baculovirus expression system » (Invitrogen)	148
Figure 33. Western blot utilisant un anticorps anti-flag (anti-DDK) pour mesurer l'expression de la protéine recombinante rGOAT-myc-DDK, après infection des cellules Sf9 par différentes concentrations de l'inoculum P3 des constructions du bacmide rGOAT-myc-DDK et	151
Figure 34. Représentation schématique des différentes conditions d'incubation testées pour mesurer in vitro l'activité de la GOAT de rat.....	152
Figure 35. Profils radioactifs obtenus après séparation par HPLC des échantillons issus de différentes conditions d'incubations	153
Figure 36. Analyse par nanoLC-ESI-MS du pic correspondant à l'octanoyl-peptide suspecté.	154
Figure 37. Spectres de masse obtenus par fragmentation MS/MS des peptides de masse [M+H] ₊ =635,3 et [M+H] ₊ =509,2 amu.	155

Liste des Tableaux

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des AGCM en comparaison d'AGCL	24
Tableau 2. Teneur en AGCM dans les laits de différentes espèces	26
Tableau 3. ANC en acides gras, pour un adulte consommant (2010).....	27
Tableau 4. Compositions des milieux réactionnels (témoin et essai) permettant la mesure de l'activité de l'enzyme malique	92
Tableau 5. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur la composition en acide gras du cerveau, dans les groupes MF, HF et CR	93
Tableau 6. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur la composition en acide gras du coeur, dans les groupes MF, HF et CR	94
Tableau 7. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur la composition en acide gras du muscle gastrocnémien, dans les groupes MF, HF et CR	95
Tableau 8. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en acide gras du foie des rats ayant consommé les régimes MF	96
Tableau 9. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en acide gras du foie des rats ayant consommé les régimes HF et CR	97
Tableau 10. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en acide gras du tissu adipeux épидидymal des rats ayant consommé les régimes MF	98
Tableau 11. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en acides gras du tissu adipeux épидидymal des rats ayant consommé les régimes HF et CR.....	99
Tableau 12. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en acide gras du tissu adipeux sous-cutané des rats ayant consommé les régimes MF	100
Tableau 13. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur la composition en acide gras du tissu adipeux sous-cutané des groupes HF et CR	101
Tableau 14. Estimation de la β -oxydation dans les hépatocytes par mesure du $^{14}\text{CO}_2$ et des métabolites acido-solubles formés pendant 4 h d'incubation avec du $[1-^{14}\text{C}]\text{-C8:0}$	137
Tableau 15. Conditions d'incubation des anticorps utilisés pour l'immunodétection des protéines par western blot (TBS-T : Tris Buffer Saline-Tween 0,5%)	150
Tableau 16. Conditions d'incubation pour la mesure de l'activité de la GOAT recombinante	

Liste des abréviations

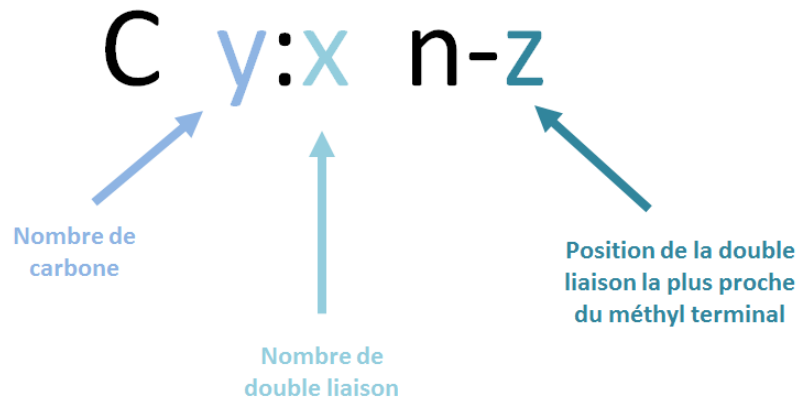
- ACC** : Acétyl-CoA carboxylase
- ACS** : Acyl-CoA synthase
- ACTH** : Corticotrophine
- ADNc** : Acide désoryribonucléique complémentaire
- AET** : Apport énergétique total
- AG** : Acide gras
- AGCC** : Acide gras à chaîne courte
- AGCL** : Acide gras à chaîne longue
- AGCM** : Acide gras à chaîne moyenne
- AGI** : Acide gras insaturé
- AGL** : Acide gras libre
- AGMI** : Acide gras monoinsaturé
- AGPI** : Acide gras polyinsaturé
- AGS** : Acide gras saturé
- AGT** : Acides gras totaux
- ALA** : Acide α -linoléinique
- amu** : atomic mass unit
- ANC** : Apport nutritionnel conseillé
- AP-1** : Activator protein-1
- APT1** : Acyl-protein thioesterase-1
- ATP** : Adénosine triphosphate
- BemPPOX** : 5-(2-(benzyloxy)ethoxy)-3-(3-phenoxyphenyl)-1,3,4-oxadiazol-2(3*H*)-one
- BF₃** : Trifluorure de bore
- BSA** : Bovine serum albumine
- C/EBPs** : CCAAT/Enhancer binding proteins
- CCK** : Cholécystokinine
- CD36** : Cluster de différenciation 36
- CETP** : Cholesterylester transfer protein
- CNIEL** : Centre national interprofessionnel de l'économie laitière
- CPG** : Chromatographie en phase gazeuse
- CR** : Caloric restriction

CREB : cAMP response element binding
CRP : Protéine C-réactive
DHA : Acide docosahexaénoïque
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
DMSO : Dimethyl sulfoxide
DTM : Domaine transmembranaire
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
ENaC : Canal sodium epithelial
EPA : acide eicosapentaénoïque
FAME : Fatty acid methyl ester ⇔ ester méthylique d'acide gras
FAS : Fatty acid synthase ⇔ acide gras synthase
FFAR : Free fatty acid receptor
GFP : Green fluorescent protein
GHSR-1a : Récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance
GLP-1 : Glucagon-like peptide 1
GOAT : Ghréline O-acyltransférase
GPR : G protein-coupled receptor
GPR120 : Récepteur couplé aux protéines G 120
HBSS : Hank's balanced salt solution
HDL : High density lipoprotein
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HF : High fat
HHAT : Hedgehog acyltransferase
HNF4- α : Facteur nucléaire hépatique 4 α
HPLC : High performance liquid chromatography
HSL : Lipase hormono-sensible
I-FABP : Intestinal type fatty acid binding protein
IGF-1 : Insulin-like growth factor I
IL : Interleukine
LA : acide linoléique
LDL : Low density lipoprotein
LPL : Lipoprotéine lipase
LT : lipides totaux
MACS : Medium-chain acyl-CoA synthetase

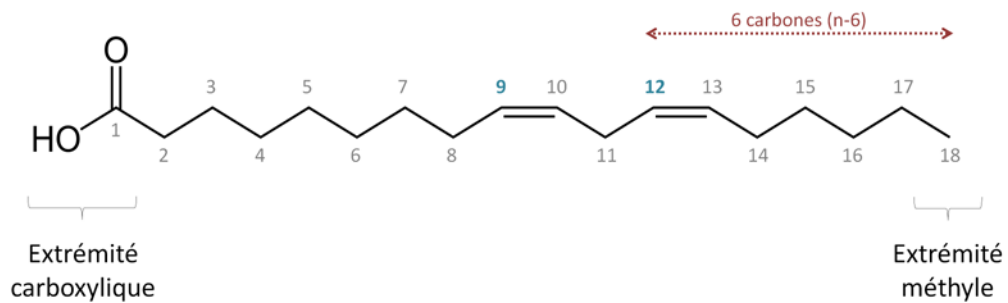
MBOAT : Membrane bound O-acyltransferase
MF : Moderate fat
MTTP : Microsomal triglyceride transfer protein
NA : NeutrAvidine
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP⁺ : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NMT : N-myristoyltransférase
PBS : Phosphate buffer saline
PCR : Polymerase chain reaction
PCRq : Polymerase chain reaction quantitative en temps réel
PIP₂ : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC : Protein kinase C
PM : Poids moléculaire
PMSF : Phenylmethysulfonyl fluoride
PNNS : Programme national nutrition santé
PO : Plan obésité
Porc : Porcupine
PPAR: Peroxisome proliferator activated receptor
PPG : Préprogréline
PYY : Polypeptide Y
RE : Réticulum endoplasmique
RIPA : Radio-immunoprecipitation assay
RLL : Rat preduodenal/lingual lipase
ROS : Reactive oxygen species
RPL : Rat pancreatic lipase
SCD1 : Stearoyl-CoA desaturase-1
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SGI : Système gastro-intestinal
SHH : Sonic hedgehog
SNC : Système nerveux central
SREBP : Sterol response element binding protein
SVF : Serum de veau foetal
TA SC : Tissu adipeux sous-cutané
TA : Tissu adipeux

TAB : Tissu adipeux brun
TAE : Tissu adipeux épидидymal
TAM : Tissu adipeux mésentérique
TBTA : Tris-(benzyltriazolylmethyl)amine
TCA : Acide trichloroacétique
TCEP : Tris-carboxyethylphosphine
TCL : Triglycéride à chaînes longues
TCM : Triglycérides à chaînes moyennes
TFA : Acide trifluoroacétique
TNF- α : Tumor necrosis factor α
Tri-C8:0 : Trioctanoïne ou tricapryline
UCP2 : Uncoupling protein 2
USF1 et 2 : Upstream stimulatory factor 1 and 2
VLDL : Very low density lipoprotein

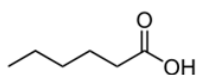
Nomenclature des acides gras



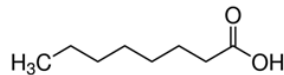
exemple de l'acide linoléique (acide *cis* 9,12-octadécadiénoïque) ↔ C18:2 n-6



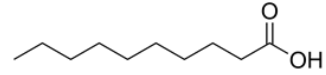
Acide hexanoïque (C6:0)



Acide octanoïque (C8:0)



Acide décanoïque (C10:0)



Catégorie	Structure	Nom systématique	Nom commun
Acides gras saturés (AGS)	C4:0	Acide butanoïque	Acide butyrique
	C6:0	Acide hexanoïque	Acide caproïque
	C7:0	Acide heptanoïque	Acide énanthique
	C8:0	Acide octanoïque	Acide caprylique
	C9:0	Acide nonanoïque	Acide pèlargonique
	C10:0	Acide décanoïque	Acide caprique
	C11:0	Acide undécanoïque	Acide undécylique
	C12:0	Acide dodécanoïque	Acide laurique
	C14:0	Acide tétradécanoïque	Acide myristique
	C15:0	Acide pentadécanoïque	Acide pentadécylique
	C16:0	Acide hexadécanoïque	Acide palmitique
	C17:0	Acide heptadécanoïque	Acide margarique
	C18:0	Acide octadécanoïque	Acide stéarique
	C20:0	Acide eicosanoïque	Acide arachidique
C22:0	Acide docosanoïque	Acide béhénique	
C24:0	Acide Tétracosanoïque	Acide lignocérique	
Acides gras monoinsaturé (AGMI)	C10:1 n-1	Acide cis 1-décène	Acide caproléique
	C12:1 n-3	Acide cis 3-dodécène	Acide laurooléique
	C14:1 n-5	Acide cis 7-tétradécène	Acide myristoléique
	C16:1 n-7	Acide cis 9-hexadécène	Acide palmitoléique
	C16:1 n-9	Acide cis 7-hexadécène	-
	C18:1 n-9	Acide cis 9-octadécène	Acide oléique
	C18:1 n-9	Acide trans 9-octadécène	Acide élaïdique
	C18:1 n-7	Acide cis 11-octadécène	Acide cis-vaccénique
	C20:1 n-9	Acide cis 11-eicosène	Acide gadoléique
	C22:1 n-9	Acide cis 13-docosène	Acide érucique
Acides gras polyinsaturé (AGPI)	C18:2 n-6	Acide cis 9,12-octadécadiène	Acide linoléique
	C20:2 n-6	Acide cis 11,14-eicosadiène	-
	C18:3 n-3	Acide cis 9,12,15-octadécatriène	Acide α -linoléique
	C18:3 n-6	Acide cis 6,9,12-octadécatriène	Acide γ -linoléique
	C20:3 n-6	Acide cis 8,11,14-eicosatriène	Acide di-homo- γ -linoléique
	C20:3 n-3	Acide cis 11,14,17-eicosatriène	-
	C20:3 n-9	Acide cis 5,8,11-eicosatriène	Acide de Mead
	C18:4 n-3	Acide cis 6,9,12,15-octadécatétraène	Acide stéaridonique
	C20:4 n-6	Acide cis 5,8,11,14-eicosatétraène	Acide arachidonique ARA
	C22:4 n-6	Acide cis 7,10,13,16-docosatétraène	Acide adrénique
	C20:5 n-3	Acide cis 5,8,11,14,17-eicosapentaène	EPA
	C22:5 n-3	Acide cis 7,10,13,16,19-docosapentaène	DPA
	C22:5 n-6	Acide cis 4,7,10,13,16-docosapentaène	-
	C22:6 n-3	Acide cis 4,7,10,13,16,19-docosahexaène	DHA

Avant-propos

L'amélioration de l'état nutritionnel de la population constitue un enjeu majeur pour les politiques de santé publique. Une alimentation équilibrée et appropriée aux besoins des individus est un facteur de protection de la santé. Une malnutrition protéino-énergétique ou des carences en nutriments essentiels (acides gras essentiels, fer ou vitamines C, B1, B3 et D) peuvent entraîner une perte de poids involontaire, une desquamation de la peau, une fragilité osseuse ou des problèmes cardiaques. A l'inverse, une alimentation trop riche en calories par rapport à la dépense énergétique peut conduire au surpoids et à l'obésité. Aux Etats-Unis, plus de 33% des adultes sont obèses (Ogden et al., 2014) contre 15% en France (Eschwege et al., 2015). L'accumulation excessive de graisses dans le tissu adipeux augmente fortement les risques d'apparition de diabète de type 2 (non insulino-dépendant), d'accidents cardio-vasculaires et de certains cancers (œsophage, pancréas, colon-rectum, seins et reins).

Face à l'augmentation de la prévalence de l'obésité, des plans de santé publique ont vu le jour, tel le Programme National Nutrition Santé (PNNS) lancé en 2001 en France et complété en 2010 par le Plan Obésité (PO). Le but principal du PNNS est de réduire l'obésité et le surpoids dans la population, en incitant à pratiquer une activité physique régulière et en améliorant les pratiques alimentaires et la qualité des apports nutritionnels. Si certains objectifs ont été atteints (apport en sel réduit, consommation de fruits accrue), l'augmentation de la prévalence de l'obésité s'est poursuivie en France entre 2009 et 2012 (de 14,5 à 15%) avec néanmoins une tendance significative à la décélération (Eschwege et al., 2015). Des données épidémiologiques, collectées dans neuf pays, montrent effectivement une stabilisation, voire même une diminution de la prévalence de l'obésité, essentiellement chez les enfants (Olds et al., 2011).

Pendant plusieurs décennies, il a été conseillé de limiter la part des lipides dans l'alimentation, ceux-ci étant considérés comme responsables de l'augmentation des maladies cardio-vasculaires et de l'obésité (Keys et al., 1984). Pourtant, outre leur rôle énergétique, les lipides sont les précurseurs de molécules régulant les fonctions cellulaires (prostaglandines, hormones stéroïdes), les constituants obligatoires de certaines structures (phospholipides des membranes) et ont un effet protecteur contre certains cancers et contre les accidents vasculaires. Tous les acides gras n'ont pas les mêmes propriétés et effets sur la santé, d'où l'importance de ne pas les considérer en bloc et d'en privilégier certains dans son régime

alimentaire, comme le recommande l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSES) dans ses Apports Nutritionnels Conseillés (ANC, 2010).

Le laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine d'Agrocampus Ouest (USC 1378, INRA, Rennes) conduit des recherches sur le métabolisme et les rôles nutritionnels des acides gras. L'objectif général de ces recherches est de mieux comprendre les voies métaboliques et les mécanismes d'utilisation des acides gras (alimentaires et synthétisés dans l'organisme), afin de pouvoir expliquer et définir les besoins nutritionnels chez l'Homme. L'équipe au sein de laquelle j'ai effectué mon doctorat s'intéresse plus particulièrement aux rôles physiologiques des acides gras saturés. Si depuis 1997 les recherches menées par l'équipe étaient focalisées sur l'acide myristique (C14:0), ce sont les acides gras saturés à chaîne moyenne (AGCM, 6 à 10 carbones) que j'ai étudiés, plus particulièrement l'acide octanoïque (C8:0). Cette thématique de recherche est financée par le CNIEL (Centre national interprofessionnel de l'économie laitière), la matière grasse laitière étant une des seules sources d'acides gras saturés à chaîne moyenne.

Les travaux de thèse sont présentés dans ce manuscrit intitulé « **Impact de l'acide octanoïque alimentaire sur l'octanoylation de la ghréline, chez le rat** ». Une synthèse bibliographique fera, dans un 1^{er} temps, le point sur les données relatives aux propriétés métaboliques et physiologiques des AGCM et plus particulièrement sur le rôle du C8:0 sur l'octanoylation de la ghréline. Après une présentation générale des objectifs de recherche, les résultats seront présentés dans quatre parties consacrées à :

- A)** l'effet de la consommation chronique d'acide octanoïque à différentes doses sur l'axe ghréline-Ghréline O-Acyltransférase (GOAT) et sur le métabolisme, chez le rat adulte ;
- B)** la démonstration de l'absorption gastrique de l'acide octanoïque (ingéré sous forme de triglycéride) par inhibition de la lipase préduodénale et l'effet de cette inhibition sur la concentration plasmatique en ghréline acylée, chez le raton ;
- C)** l'étude préliminaire du métabolisme du C8:0 dans les cellules gastriques *in vitro*, comparé au métabolisme dans les hépatocytes ;
- D)** l'étude préliminaire de l'activité de la ghréline O-Acyltransférase (GOAT) *in vitro*, enzyme responsable de l'octanoylation de la ghréline.

Pour chaque partie, le contexte et les objectifs ainsi que les méthodologies expérimentales utilisées seront détaillés, suivis des résultats des recherches et d'une discussion. Ce mémoire se terminera par une discussion générale, accompagnée des perspectives.

Synthèse bibliographique

Tableau 1. Propriétés physico-chimiques des AGCM (C6:0, C8:0, C10:0) en comparaison d'AGCL (C16:0, C18:1 n-9)

	C6:0	C8:0	C10:0	C16:0	C18:1 (n-9)
Masse molaire (g/mol)	116,15	144,21	172,26	256,42	282,46
Point de fusion (°C)	-3,4	16,5	31,9	62,5	13,4
Solubilité dans l'eau (g/L à 20 °C)	11	0,68	0,15	<i>non soluble</i>	<i>non soluble</i>
Tension superficielle (dyn/cm)	23,4	23,7	25,0	28,2	32,8
Densité (à 20 °C)	0,93	0,91	0,89	0,85	0,89
pKa (à 25 °C)	4,88	4,89	4,90	4,75	5,02

Cette synthèse bibliographique a pour objectif de présenter le groupe des acides gras saturés à chaîne moyenne (AGCM) en détaillant plus spécifiquement les caractéristiques de l'acide octanoïque (acide caprylique, C8:0), capable d'acyler la ghréline. La 1^{ère} partie présentera les spécificités métaboliques des AGCM, de leur digestion à leur utilisation cellulaire, comparées à celles des acides gras à chaîne longue (AGCL). Dans la 2^{ème} partie, les propriétés physiologiques des AGCM ainsi que leurs utilisations dans le cas de certaines pathologies seront détaillées. Une 3^{ème} partie s'intéressera à l'octanoylation de la ghréline par la ghréline O-acyltransférase (GOAT) et aux effets de cette acylation.

1. Métabolisme des AGCM : synthèse, digestion, absorption et utilisation cellulaire

1.1. Définition des AGCM

Les acides gras sont divisés en deux groupes : les saturés (AGS) et les insaturés (AGI). La différence entre ces deux classes est l'absence (pour les AGS) ou la présence (pour les AGI) d'au moins une double liaison dans la chaîne hydrocarbonée. Les acides gras sont également différenciés selon le nombre de carbones qui les constituent. Les acides gras à chaîne longue (AGCL) possèdent 12 carbones ou plus. En dessous de 12 carbones, il s'agit d'acides gras à chaîne moyenne (AGCM) constitués de 6 à 10 carbones, et d'acides gras à chaîne courte (AGCC) avec moins de 6 carbones.

Les acides gras qui constituent la famille des AGCM sont donc l'acide caproïque ou hexanoïque (acide carboxylique à 6 carbones, noté C6:0), l'acide caprylique ou octanoïque (C8:0) et l'acide caprique ou décanoïque (C10:0). Il arrive parfois que l'acide dodécanoïque ou laurique (C12:0) soit inclus parmi les AGCM, mais cet acide gras possède les caractéristiques physico-chimiques des acides gras à chaîne plus longue et ne sera pas considéré ici comme un AGCM. Les AGCM se distinguent des AGCL par leurs caractéristiques physico-chimiques (**Tableau 1**) : des points de fusion bas, une grande solubilité dans les milieux aqueux et une tension superficielle avec l'eau inférieure à celle des

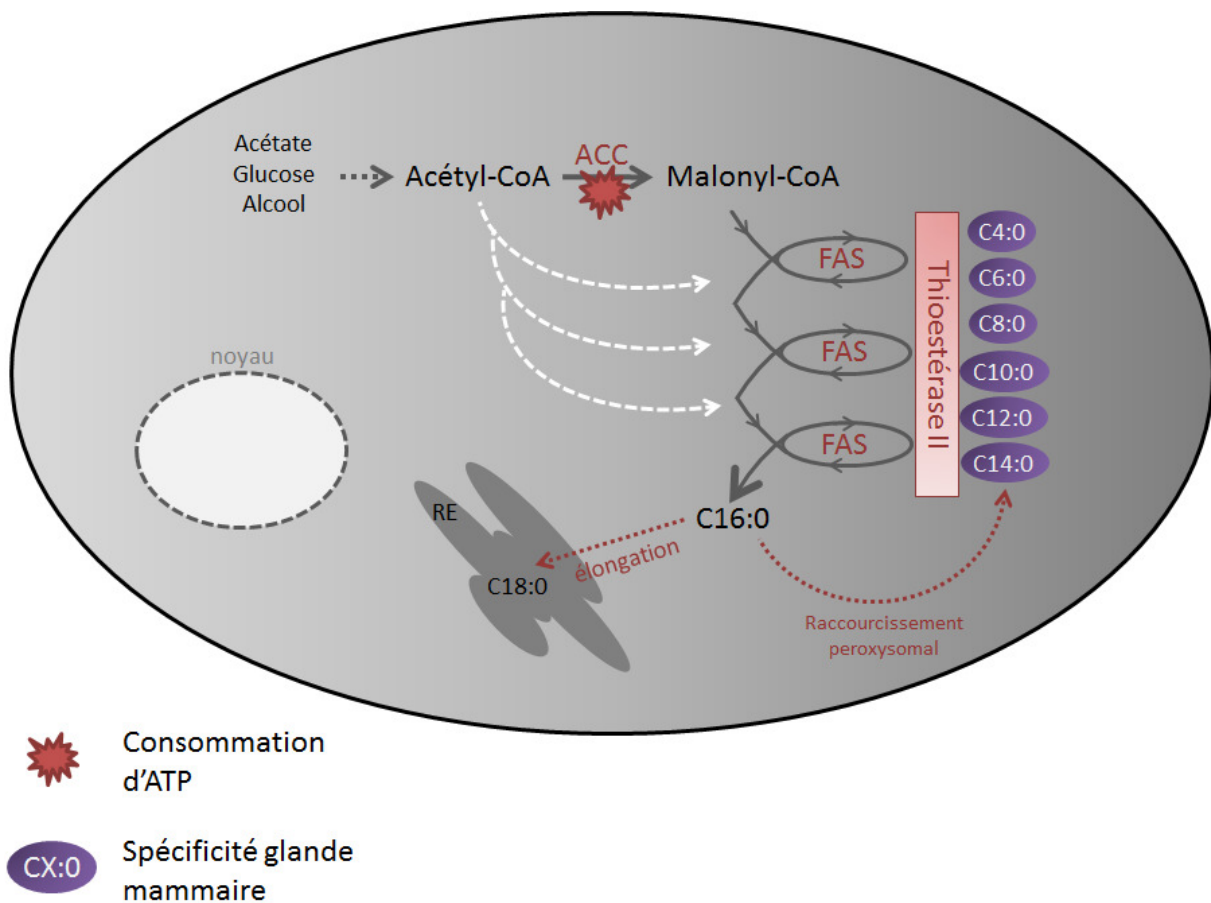


Figure 1. Synthèse *de novo* des AGCM dans les cellules de la glande mammaire en lactation

L'acétyl-CoA est carboxylé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), puis condensé avec de l'acétyl-CoA, décarboxylé, réduit et déshydraté et réduit une 2^{ème} fois par l'Acide gras synthase (FAS) (Wakil *et al.*, 1983). A chaque tour d'hélice, l'acide gras formé est allongé de deux carbones. Contrairement au foie et au tissu adipeux, la thioestérase présente dans les cellules de la glande mammaire permet de libérer les acides gras avant qu'ils n'atteignent une longueur de chaîne de 16 carbones (C4:0 à C14:0).

RE : réticulum endoplasmique

AGCL. Ces caractéristiques physico-chimiques ont de nombreuses conséquences sur le métabolisme des AGCM et sur leurs propriétés physiologiques.

1.2. Origines endogène et alimentaire des AGCM

1.2.1. Synthèse *de novo* des AGCM

Contrairement aux AGCL qui sont synthétisés principalement dans le foie, le cerveau et le tissu adipeux, la synthèse *de novo* des AGCC et AGCM (C4:0 à C10:0) a seulement été décrite dans la glande mammaire en lactation. Les 1^{ères} étapes de la synthèse des acides gras à chaîne courte, moyenne ou longue sont identiques et se déroulent dans le cytosol (**Figure 1**) (Wakil et al., 1983) :

- Un acétyl-CoA est carboxylé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC).
- L'étape suivante est catalysée par un complexe multienzymatique, l'acide gras synthase (FAS, Fatty acid synthase) (Griffin, 2004). Un acyl-CoA à 4 carbones (butyryl-CoA) est formé, à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA, par un cycle de quatre réactions : condensation des deux substrats et décarboxylation (avec libération de CO₂), 1^{ère} réduction, déshydratation, 2^{ème} réduction.
- La répétition de ces quatre réactions, appelée hélice de Wakil (Wakil et al., 1983), conduit à l'élongation de l'acyl-CoA par groupe de deux carbones à chaque cycle.

Dans le foie, le cerveau et le tissu adipeux, la réaction s'arrête quand l'acyl-CoA comporte 16 carbones (palmitoyl-CoA). Le palmitoyl-CoA est hydrolysé par la thioestérase I, incluse dans le complexe FAS, qui libère l'acide palmitique dans le cytosol (Singh et al., 1984). Dans la glande mammaire en lactation, en revanche, l'acyl-CoA peut être hydrolysé et libéré du complexe FAS avant d'avoir atteint une longueur de 16 carbones, permettant ainsi la synthèse d'AGCM. Chez les mammifères non-ruminants, la libération d'AGCM est due à la présence de la thioestérase II cytosolique, indépendante du complexe FAS (Libertini et al., 1978). Chez le ruminant, cette synthèse est catalysée par la thioestérase I, mais celle-ci possède une affinité plus forte que dans les autres tissus pour les acyl-CoA à chaîne plus courte (Kumar et al., 1981). Dans les hépatocytes, une β -oxydation peroxysomale de l'acide palmitique (C16:0) conduisant à un raccourcissement partiel de la chaîne carbonée en acide myristique (C14:0) a

Tableau 2. Teneur en AGCM dans les laits de différentes espèces

	C6:0	C8:0	C10:0	Σ AGCM
Chienne	0	0	Traces	0
Cobaye	0	0	0	0
Femme	0.2	0.5	1	1.7
Jersey	5	2.4	4.8	12.2
Holstein	2.9	1.4	2.3	6.6
Chèvre	6.9	5.8	7.9	20.6
Brebis	3.4	2.3	3.4	9.1
Jument	0.7	2.4	12.3	15.4
Rate	0	5.8	16.5	22.3
Lapine	0	25	20	45

Les valeurs en % d'acide gras totaux (% AGT) constituent des ordres de grandeur de la teneur en AGCM. La composition du lait étant fortement dépendante du régime alimentaire et d'autres facteurs (phase de lactation, génétique), des valeurs différentes peuvent être mesurées.

été observée (Rioux et al., 2007), mais il ne semble pas que cela puisse conduire à la synthèse d'acides gras à chaîne moyenne.

1.2.2. Sources alimentaires naturelles et synthétiques des AGCM

Les matières grasses alimentaires, d'origine animale ou végétale, sont principalement constituées d'AGCL (≥ 12 carbones) mais il existe quelques sources naturelles d'AGCM. C'est le cas des produits laitiers qui contiennent des acides gras à chaîne courte et moyenne. L'abondance de ces acides gras dans la matière grasse laitière varie fortement selon l'âge, l'espèce, la race, la phase de lactation et le régime alimentaire. Les teneurs moyennes en C6:0, C8:0 et C10:0 dans les laits de diverses espèces animales sont présentées dans le **Tableau 2**. Le C8:0 représente entre 0 et 0,5% des acides gras totaux (AGT) dans le lait humain (Jensen, 1996), 1-2% dans le lait de vache (Jensen et al., 1990), 3-6% dans le lait de chèvre (Alonso et al., 1999), 5-6% dans le lait de rate (Fernando-Warnakulasuriya et al., 1981) et atteint 15-18 % dans le lait de lapine (Perret, 1980). Les AGCM sont présents sous forme de triacylglycérol (ou triglycéride) constitué d'une molécule de glycérol estérifiée avec trois acides gras. Les AGCM du lait sont essentiellement estérifiés en position *sn*-3 des triglycérides dans les laits de vache (Jensen et al., 1990), de rate (Staggers et al., 1981) et de femme (Jensen, 1996).

L'huile de coprah et l'huile de palmiste (extraite des noyaux du fruit du palmier à huile) sont des sources végétales naturelles d'AGCM. La part d'acides gras avec moins de 14 carbones s'élève à plus de 50% des acides gras totaux (AGT) dans ces huiles, dont 6 à 10% d'acide octanoïque dans l'huile de coprah et 2 à 5% dans l'huile de palmiste (Karleskind, 1992). Ces huiles contiennent une quantité importante d'acide dodécanoïque (respectivement 39 à 54% et 44 à 51% des AGT) et d'acide décanoïque (5 à 10% et 3 à 5% des AGT). Les AGCM des huiles de coprah et palmiste sont estérifiés en position *sn*-1 et *sn*-3 des triglycérides.

Il existe des sources synthétiques de triglycérides à chaîne moyenne (TCM) appelés huiles TCM. Ces huiles sont produites par hydrolyse des huiles de coprah et de palmiste suivie d'une purification des AGCM puis d'une réestérification. Les huiles TCM contiennent presque exclusivement du C8:0 et du C10:0 avec un ratio compris entre 50:50 et 80:20 (Bach et al., 1982).

Tableau 3. Apports nutritionnels conseillés en acides gras, pour un adulte consommant 2000 kcal/jour (2010)

Lipides totaux		35-40
Acides gras indispensables	Acide linoléique (C18:2 n-6)	4
	Acide α -linoléique (C18:3 n-3)	1
	Acide docosahexaénoïque (DHA)	250 mg
	Acide eicosapentaénoïque (EPA)	250 mg
Acides gras non indispensables	Acide laurique (C12:0)	} ≤ 8
	Acide myristique (C14:0)	
	Acide palmitique (C16:0)	
	Acides gras saturés totaux	≤ 12
	Acide oléique (C18:1 n-9)	15-20
	Autres AG non indispensables	-

Valeurs en % de l'apport énergétique total (AET)

1.2.3. Apport en AGCM dans l'alimentation et apports nutritionnels conseillés

Dans les régimes alimentaires occidentaux, les AGCM représentent moins de 2% de l'apport énergétique total (AET) et sont essentiellement d'origine laitière. Cette valeur peut être plus élevée dans les régimes alimentaires asiatiques, où les huiles de coprah et de palmiste sont plus couramment consommées. La consommation d'huile TCM augmente l'apport énergétique en AGCM, mais cette huile est surtout utilisée en nutrition clinique (orale, entérale ou parentérale) (Takeuchi et al., 2008).

Il n'y a pas d'apports nutritionnels conseillés spécifiques pour les AGCM (**Tableau 3**, ANC 2010). Ce ne sont pas des acides gras dits essentiels et leur éviction ne semble pas entraîner de conséquences néfastes sur la santé. L'ANSES a fixé l'apport maximal en acides gras saturés à 12% de l'apport énergétique total (AET) pour un apport journalier total de 2000 kcal, dont 8% pour la somme du C16:0, C14:0 et C12:0. Ainsi, les 4% restants correspondent à l'apport maximal en C20:0, C18:0, C10:0, C8:0, C6:0 et C4:0. On peut estimer par déduction qu'environ 2% de l'AET sont apportés par le C20:0, C18:0 et que les 2% restants sont apportés par les autres acides gras (C4:0 au C10:0).

1.3. Digestion des AGCM, comparés aux AGCL

Environ 95% des lipides alimentaires provenant des graisses animales, des produits laitiers ou des huiles végétales sont des triglycérides, 4,5% des phospholipides et 0,5% des esters de cholestérol. Sous ces formes, les lipides ne sont pas absorbables par l'intestin et doivent donc être hydrolysés, par exemple en acides gras libres et en monoglycérides pour les triglycérides. Les étapes de digestion des AGCM diffèrent par rapport aux AGCL (**Figure 2**).

1.3.1. Émulsification des lipides

La 1^{ère} étape de la digestion des lipides est l'émulsification qui correspond à la dispersion de ces lipides dans le milieu aqueux, sous forme de gouttelettes. Pour les AGCM d'origine laitière, cette étape est très courte (voire inexistante) puisque les lipides laitiers sont déjà émulsifiés. Dans le cas général, l'émulsification commence dès la cuisson des aliments, se poursuit avec la mastication et finit dans le tractus digestif (Armand et al., 1996). L'émulsification se fait lentement dans l'estomac, sous l'action de mouvements péristaltiques qui fragmentent les gouttes lipidiques en gouttelettes, et par la présence de composés

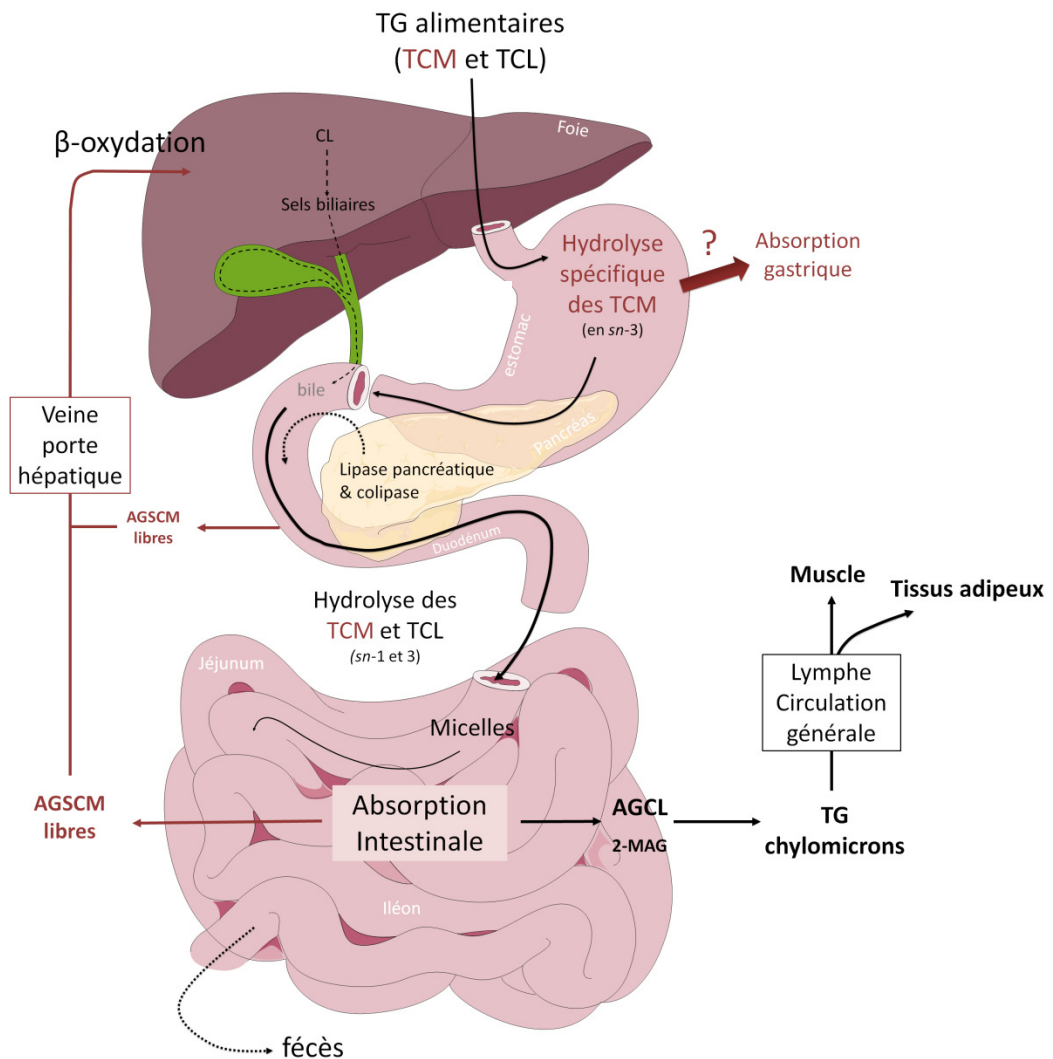


Figure 2. Digestion et absorption des AGCM, comparé aux AGCL

Après ingestion des triglycérides (TG) alimentaires, l'hydrolyse des triglycérides à chaîne moyenne (TCM) commence très rapidement, dans la cavité buccale chez le rat et dans l'estomac chez l'Homme, sous l'action de la lipase préduodénale qui agit préférentiellement en position *sn-3* des TG. L'hydrolyse des TCM est complétée dans l'intestin par la lipase pancréatique. Les AGCM ainsi libérés sont absorbés au niveau duodénal et jéjunal puis sont transportés jusqu'au foie où ils sont catabolisés, en passant par la veine porte sous forme non estérifiés, liés à l'albumine. Il est probable que la libération précoce des AGCM permette également leur absorption dans l'estomac. Les triglycéride à chaîne longue (TCL) sont hydrolysés plus lentement essentiellement par la lipase pancréatique, absorbés dans l'intestin, réestérifiés avec les 2-monoacylglycérol (2-MAG) également absorbés par les entérocytes, incorporés dans les chylomicrons et transportés jusqu'aux organes périphériques.

amphiphiles (protéines et phospholipides du bol alimentaire) qui stabilisent les gouttelettes en se positionnant à l'interface huile-eau. Le processus s'accélère dans l'intestin grâce à la sécrétion des sels biliaires et pancréatiques (Iqbal et al., 2009; Mu et al., 2004). Les sels biliaires abaissent la tension superficielle à l'interface huile-eau, diminuant la taille des gouttelettes. Les propriétés physico-chimiques des AGCM (**Tableau 1**) facilitent l'émulsification des triglycérides à chaîne moyenne (TCM) en comparaison des triglycérides à chaîne longue (TCL). L'émulsification augmente la surface d'interface eau-huile, ce qui va permettre aux lipases digestives d'agir et d'amorcer la 2^{ème} étape de la digestion.

1.3.2. Lipolyse des AGCM estérifiés par les lipases digestives

1.3.2.1. Rôles des lipases digestives gastro-intestinales

La lipolyse gastro-intestinale est une étape clef de la digestion des lipides qui implique des mécanismes physico-chimiques, biochimiques et enzymatiques. Plusieurs lipases (triacylglycérol hydrolases, EC 3.1.1.3) participent à la lipolyse. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des triglycérides en acides gras libres et diglycérides puis monoglycérides, qui vont pouvoir être absorbés par les entérocytes. Ainsi, les substrats des lipases sont hydrophobes alors que ces enzymes hydrophiles sont dans la phase aqueuse. Pour que les lipases soient actives, elles doivent donc se placer à l'interface huile-eau, mise en place suite à l'émulsification des graisses. L'augmentation de la surface d'interface huile-eau lors de l'émulsification favorise le phénomène physico-chimique d'adsorption des lipases (Aloulou et al., 2006). Chez de nombreuses espèces animales, deux lipases digestives principales sont responsables de l'hydrolyse des triglycérides. La longueur de chaîne des acides gras influe sur la lipolyse par les lipases.

1.3.2.2. Lipases préduodénales et libération précoce des AGCM

1.3.2.2.1. Origines des lipases préduodénales

La lipolyse des triglycérides alimentaires commence rapidement après leur ingestion, sous l'action de la lipase préduodénale. La synthèse et la sécrétion de cette enzyme ne se font pas au même niveau du tractus digestif selon les espèces. Elle est d'origine linguale chez le rat et la souris, produite dans les glandes séreuses de Von Ebner (Fernando-Warnakulasuriya et al., 1981; Roberts et al., 1984), d'origine pharyngiale chez le veau, l'agneau et le cabri

(Timmermans et al., 1996) et d'origine gastrique chez le cobaye, le chat, le chien, le cheval, l'Homme, le lapin, le porc et le singe (Carrière et al., 1993b; Moreau et al., 1988a). Quel que soit le lieu de synthèse des lipases préduodénales, elles sont le produit d'un seul gène, orthologue chez toutes les espèces. Pourtant, de nombreuses publications anciennes ou récentes, font référence à la lipase linguale humaine (Jensen et al., 1982; Kawai et al., 2003; Kulkarni et al., 2014; Liao et al., 1984), mais il s'agit d'une extrapolation des résultats observés en modèle murin. La mesure de l'activité lipolytique des triglycérides dans des homogénats des différentes régions du tractus digestif obtenus à partir de dons d'organes humains a montré sans ambiguïté que seuls les homogénats d'estomacs contenaient la lipase préduodénale (Moreau et al., 1988b).

La lipase linguale de rat a été la première lipase préduodénale à être purifiée et clonée (Docherty et al., 1985). Il s'agit d'une glycoprotéine d'environ 52 kDa. Une séquence hydrophobe de 18 acides aminés a été identifiée. La séquence protéique de la lipase linguale de rat présente peu d'homologies avec la lipase pancréatique, excepté pour 6 acides aminés (a.a) proches de la sérine 152 essentielle à l'action catalytique (Winkler et al., 1990). La lipase gastrique humaine a été la seconde lipase préduodénale clonée (Bodmer et al., 1987). La séquence d'a.a. présente 78 % d'homologie avec la lipase linguale de rat et peu d'homologies avec la lipase pancréatique. Les autres lipases préduodénales sont toutes des glycoprotéines (15 % environ de glucides) d'environ 45 à 51 kDa, le poids moléculaire variant selon le degré de glycosylation.

1.3.2.2.2. Lipolyse des AGCM estérifiés par les lipases préduodénales

1.3.2.2.2.1. Spécificités des lipases préduodénales

Les lipases préduodénales présentent plusieurs spécificités d'action. Premièrement, ces enzymes ont une activité élevée sur les triglycérides, plus faible sur les diglycérides et *quasi* nulle sur les monoglycérides. Elles n'hydrolysent ni les phospholipides, ni les esters de cholestérol. Deuxièmement, elles agissent en priorité sur les acides gras estérifiés en position *sn*-3 des triglycérides et plus faiblement en position *sn*-1 des diglycérides (Carrière et al., 1997; Liao et al., 1984). Ainsi, les produits majoritaires de la lipolyse des lipases préduodénales *in vivo* sont les 1,2-diglycérides, les 2-monoglycérides et les acides gras libres.

En conséquence de cette spécificité des lipases préduodénales pour l'hydrolyse des positions *sn*-1 et *sn*-3, l'action de ces lipases entraîne rapidement la libération des acides gras à chaînes courte et moyenne dans le tractus digestif (Rogalska et al., 1993; Roman et al., 2007; Sams et al., 2016), ceux-ci étant naturellement présents en position *sn*-3 des triglycérides d'origine laitière, et *sn*-1 et *sn*-3 dans les huiles de palmiste et coprah.

Les lipases préduodénales sont actives lorsque le pH est compris entre 2 et 7, avec un optimum autour de 4-5 (Sams et al., 2016). L'activité préférentielle des lipases préduodénales à pH acide n'est pas due à un effet du pH sur la conformation spatiale de leur site actif mais au phénomène physico-chimique d'adsorption des lipases, à l'interface huile-eau (Chahinian et al., 2006). Les lipases préduodénales sont donc actives dans l'estomac mais également dans le duodénum où le pH est compris entre 6 et 7 (Roberts et al., 1984).

Les lipases préduodénales restent actives en présence de sels biliaires, de pepsine et sont stabilisées par la présence de triglycérides et de phospholipides, *in vivo* et *in vitro* (Roberts, 1988). Elles sont en revanche inhibées par certains produits de la réaction qu'elles catalysent, c'est-à-dire par les acides gras libres et les monoglycérides à chaîne longue qui s'accumulent à l'interface huile-eau. Cet effet inhibiteur des produits de la lipolyse gastrique est levé lorsque le bol alimentaire est vidangé dans l'intestin, sous l'action des sels biliaires et pancréatiques. Les acides gras à chaînes moyenne et courte n'inhibent pas la lipase préduodénale.

L'activité des lipases préduodénales est plus forte chez le jeune (chez l'Homme (Hamosh et al., 1981) et le rat (Hamosh et al., 1978)) et diminue significativement avec l'âge. Une étude post-mortem chez l'homme (Moreau et al., 1988b) a observé que l'activité lipolytique passait de 4700 U/g de muqueuse fundique chez un sujet de 50 ans à 700 U/g chez une personne de plus de 60 ans.

1.3.2.2.2. Importance physiologique des lipases préduodénales

Les lipases préduodénales sont décrites comme jouant deux rôles principaux dans la digestion des lipides. Premièrement, ces enzymes permettent la libération précoce d'AGCM dans le contenu gastrique. Cela est particulièrement important en contexte périnatal où les AGCM du lait vont pouvoir être hydrolysés puis absorbés très rapidement pour être utilisés

comme source d'énergie. Sachant que l'activité de la lipase pancréatique n'est pas optimale aux stades précoces de développement, le rôle de la lipase préduodénale est d'autant plus significatif physiologiquement. Deuxièmement, l'action de la lipase préduodénale facilite l'action de la lipase pancréatique (Gargouri et al., 1986a). En effet, la libération dans l'estomac de diglycérides et de monoglycérides, plus polaires que les triglycérides, favorise l'émulsification (en plus des contractions péristaltiques). Par la suite, la lipase pancréatique va pouvoir être adsorbée plus rapidement au niveau de l'interface huile-eau et être active très peu de temps après la vidange gastrique.

1.3.2.2.3. Contribution à la lipolyse totale

Pendant de nombreuses années, la contribution des lipases préduodénales à la lipolyse totale des triglycérides alimentaires a été sujette à controverse. Une étude chez des veaux souffrant d'insuffisance pancréatique observait que 50% des lipides laitiers étaient digérés à la sortie du jéjunum, contre 60% chez des veaux sains et que 70% des lipides étaient absorbés, en absence de sucs pancréatiques, grâce à l'action de la lipase préduodénale (Gooden et al., 1973). Une autre étude chez des patients atteints de la mucoviscidose, ayant une baisse d'excrétion de la lipase pancréatique, montrait une activité importante de la lipase gastrique dans le duodénum. En absence d'activité de la lipase pancréatique, 40 à 70% des graisses alimentaires étaient hydrolysées et absorbées (Abrams et al., 1984). Certains travaux *in vitro* suggéraient également que les lipases préduodénales agissaient préférentiellement dans le duodénum (Gargouri et al., 1986a) en synergie avec la lipase pancréatique (Gargouri et al., 1986b) tandis que d'autres travaux montraient que ces enzymes purifiées étaient inhibées par la lipase pancréatique (Bernbäck et al., 1987) et donc inactivées dans l'intestin (Roberts, 1988). Finalement, d'après une étude effectuée chez le chien, il semblerait que la lipase gastrique hydrolyse 17,5% des acides gras portés par les triglycérides *in vivo*. Or, sachant que seulement deux acides gras sur les trois estérifiés en triglycéride doivent être hydrolysés pour permettre une absorption intestinale complète, la contribution de la lipase gastrique à la lipolyse des triglycérides a été estimée plus précisément à 25% de la lipolyse totale, chez le sujet sain (Carrière et al., 1993). L'activité spécifique de la lipase gastrique est très forte *in vivo*, il a même été montré qu'elle pouvait réaliser la lipolyse complète d'un repas test *in vitro*. Néanmoins, elle est faiblement concentrée dans le suc gastrique ce qui rend nécessaire

son association avec la lipase pancréatique (Carrière et al., 2000). Chez les patients souffrant d'insuffisance pancréatique exocrine, cette valeur peut, *a priori*, atteindre 30% de la lipolyse totale grâce à une sécrétion accrue de lipase préduodénale (Carrière et al., 2005).

1.3.2.3. Rôle de la lipase pancréatique

La lipolyse des triglycérides, amorcée dans l'estomac, se poursuit et s'achève dans l'intestin, après vidange du contenu gastrique. Le pancréas, organe endocrine et exocrine, sécrète dans la lumière intestinale les sucs pancréatiques contenant plusieurs lipases dont la lipase pancréatique. Dès les premières sections de l'intestin grêle, la lipase pancréatique hydrolyse une part importante des triglycérides (Lowe, 2002). La lipase pancréatique est, comme la lipase préduodénale, une enzyme qui agit à l'interface huile-eau (Benzonana et al., 1965; Sarda et al., 1958). Elle hydrolyse spécifiquement les positions *sn*-1 et *sn*-3 des triglycérides et libère des 2-monoglycérides et des acides gras libres (Mattson et al., 1968). Pour pouvoir hydrolyser les triglycérides, la lipase pancréatique requiert la présence d'une colipase, présente dans les sucs pancréatiques sous forme de pro-colipase et activée dans la lumière intestinale par la trypsine après clivage d'un pentapeptide N-terminal. La colipase, en se fixant à la surface des gouttelettes lipidiques, permet à la lipase pancréatique d'accéder aux triglycérides malgré la présence des acides biliaires à l'interface huile-eau. Son adsorption à la surface des globules est facilitée par les AGCL (Gargouri et al., 1989). La sécrétion pancréatique exocrine est contrôlée par des hormones gastro-intestinales et pancréatiques à l'action stimulatrice (sécrétine, cholécystokinine (CCK), motiline) ou inhibitrice (somatostatine, polypeptide pancréatique, peptide YY (PYY)).

L'altération de la lipolyse, en cas d'une insuffisance pancréatique exocrine qui peut apparaître suite à une pancréatite (inflammation du pancréas), un cancer (obstruction des canaux pancréatiques par une tumeur) ou dans certaines maladies génétiques altérant la fonction exocrine (mucoviscidose), entraîne une malabsorption des graisses et une malnutrition caractérisée par une stéatorrhée et une perte de poids (Buscail et al., 2010). Une supplémentation en extraits pancréatiques (d'origine porcine) permet de rétablir l'absorption normale des graisses.

1.3.2.4. Inhibiteurs de lipases

Les inhibiteurs des lipases digestives sont utilisés en traitement pharmacologique pour favoriser une perte de poids chez des patients en surpoids ou obèses. L'Orlistat (Xenical®) est un inhibiteur des lipases digestives préduodénale et pancréatique et est commercialisé dans de nombreux pays (Hill et al., 1999). La prise d'Orlistat permet de limiter l'absorption des graisses d'environ 30 % (Hauptman et al., 1992; McNeely et al., 1998) mais elle est associée à des effets secondaires gênants (diarrhée, incontinence fécale, douleurs abdominales). De plus, l'Orlistat réduit également l'absorption des vitamines liposolubles et des acides gras essentiels de la famille des $\omega 3$ (Cruz-Hernandez et al., 2010), ce qui peut favoriser les carences. Les effets de l'Orlistat sur certaines hormones digestives ont été étudiés chez le rat (Porsgaard et al., 2003) et l'Homme (Ellrichmann et al., 2008) et une diminution de la sécrétion des hormones anorexigènes (CCK, PYY) a été observée, ce qui pourrait contribuer à la reprise de poids observée chez les patients utilisant ce médicament.

1.3.3. Absorption des AGCM dans le tractus-digestif

Les AGCM sont précocement libérés dans le tractus digestif sous l'action de la lipase préduodénale et donc, rapidement absorbables par les entérocytes. Ainsi, ces acides gras pénètrent la muqueuse intestinale dès le niveau duodénal, par simple diffusion sous forme protonée. Pour les acides gras à chaîne plus longue et les 2-monoglycérides, la diffusion à travers la membrane des entérocytes se déroule également de manière passive, lorsque la concentration en acides gras libres dans la lumière intestinale est plus élevée que dans les cellules (Hussain, 2014). Quand ce n'est pas le cas, l'absorption est rendue possible par un transport actif protéique. Plusieurs protéines, notamment le cluster de différenciation 36 (CD 36) (Abumrad et al., 1998) sont impliquées dans le transport actif des lipides.

Après avoir franchi la membrane des cellules intestinales, les AGCL sont transportés par la protéine I-FABP (Intestinal Type Fatty Acid Binding Protein) entérocytaire et activés dans le cytosol en acyl-CoA, par l'acyl-CoA synthétase. Puis, les AGCL sont réestérifiés dans le réticulum endoplasmique (RE) avec les 2-monoglycérides en triglycérides. Les triglycérides ainsi formés sont empaquetés dans les chylomicrons sous l'action des protéines MTTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein) et sécrétés dans le système lymphatique, puis

dans la circulation sanguine, pour atteindre les organes périphériques (Hussain, 2014). Or, la protéine I-FABP et l'acyl-CoA synthétase ont peu d'affinités pour les AGCM. Par conséquent, ces derniers quittent les entérocytes et passent très rapidement dans la veine porte qui irrigue le foie, sous forme non estérifiés et liés à l'albumine (Bach et al., 1982).

Il est possible qu'une partie des AGCM libérés dans l'estomac (plus particulièrement l'acide octanoïque) par la lipase préduodénale (Aw et al., 1980; Egelrud et al., 1971) soit absorbée au niveau de la muqueuse gastrique (Perret, 1980). Cependant, la quantité d'acides gras impliquée dans cette absorption gastrique, le mécanisme d'absorption et le devenir des AGCM ne sont pas connus (Lai et al., 1998; Perret, 1980).

1.4. Utilisation cellulaire des AGCM dans le foie

1.4.1. Entrée des AGCM dans la matrice mitochondriale

Les AGCM alimentaires circulent par la veine porte, qui irrigue le foie, puis sont captés par les hépatocytes. Une fois dans le cytoplasme, ces acides gras vont rapidement traverser la double membrane des mitochondries. En effet, contrairement aux AGCL, les AGCM ne requièrent pas l'action de la carnitine palmitoyl transférase (CPT, EC 2.3.1.21) pour entrer dans la matrice mitochondriale (Papamandjaris et al., 1998). Les enzymes responsables de la synthèse des triglycérides et des phospholipides ont peu d'affinités pour les AGCM ce qui explique que ces derniers ne soient pas stockés dans le foie (Papamandjaris et al., 1998), excepté dans les hépatocytes isolés de lapereau à la naissance, effet disparaissant avec l'âge (Pégorier et al., 1989).

1.4.2. Activation des AGCM en acyl-CoA par les ACSM

Les AGCM sont ensuite activés en acyl-CoA dans la matrice mitochondriale des hépatocytes par des Acyl-CoA synthétases spécifiques des chaînes moyennes, les ACSM (pour Medium-chain Acyl-CoA synthetase, EC 6.2.1.2) (Kochan et al., 2009; Watkins, 1997). Sur les 26 acyl-CoA synthétases connues, sept ont été identifiées comme spécifiques des AGCM : les ACSM 1, 2A, 2B, 3, 4, 5 et 6.

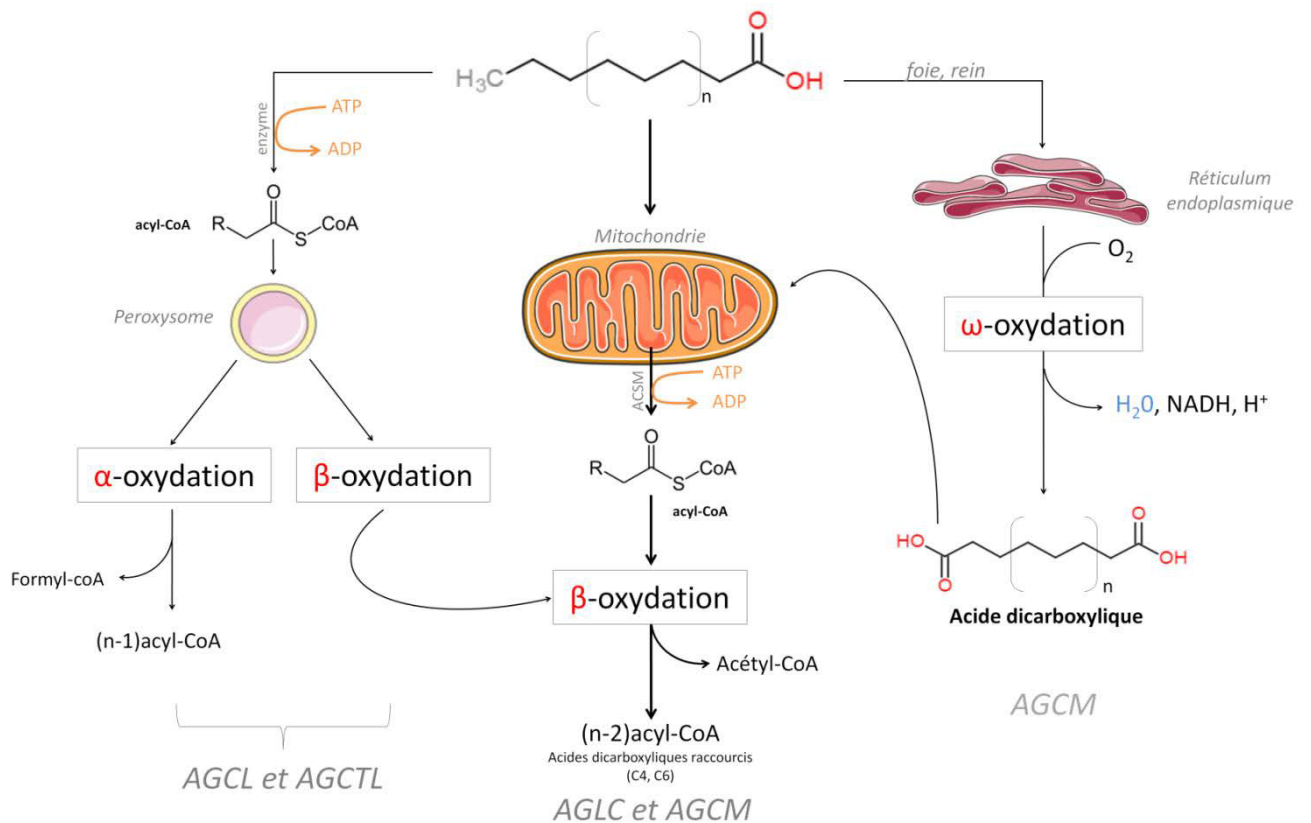


Figure 3. Voies cataboliques des AG selon la longueur de chaîne

Les AGCM peuvent être β -oxydés après activation sous forme d'acyl-CoA, dans la matrice mitochondriale. Les produits de la β -oxydation mitochondriale sont l'acétyl-CoA, l'ATP et des cofacteurs réduits. Dans le foie et les reins, les AGCM peuvent être ω -oxydés en acides dicarboxyliques, pouvant ensuite être redirigés vers les mitochondries pour être β -oxydés en acides dicarboxyliques plus courts. Les AGCL peuvent être α ou β -oxydés dans les peroxysomes.

1.4.3. β -oxydation mitochondriale des AGCM

Les AGCM activés en acyl-CoA sont ensuite β -oxydés dans la matrice mitochondriale (Babayan, 1987) selon la même chaîne de réaction que les AGCL (hélice de Lynen). Leur catabolisme va permettre la formation d'acétyl-CoA qui pourra être oxydé dans le cycle de Krebs ou réutilisé dans des voies de synthèse et la formation de NADH et de FADH₂, nécessaires à la production d'ATP dans la chaîne respiratoire. Les AGCM sont plus fortement oxydés que les AGCL, chez le rongeur (Crozier et al., 1987; Noguchi et al., 2002) et chez l'Homme (Metges et al., 1991; St-Onge et al., 2003b).

1.4.4. Autres voies cataboliques des AGCM

En plus de la β -oxydation mitochondriale, la β -oxydation peroxysomale peut dégrader les acides gras. Cependant, il est peu probable que les AGCM empruntent cette voie, celle-ci étant réservée aux acides gras à chaîne très longue (Reubsæet et al., 1988) qui sont raccourcis puis α -oxydés dans les peroxysomes ou redirigés dans les mitochondries pour que la β -oxydation soit complète (**Figure 3**).

Quand le substrat de la β -oxydation mitochondriale est en excès, les AGCM peuvent être ω -oxydés dans le réticulum endoplasmique (RE) et transformés en acides dicarboxyliques suite à une réaction utilisant de l'O₂ et entraînant la réduction de cofacteurs. Les acides dicarboxyliques peuvent ensuite être β -oxydés dans la mitochondrie, en acides dicarboxyliques raccourcis (Christensen et al., 1991; Wanders et al., 2011). L' ω -oxydation évite l'accumulation d'acides gras libres dans la cellule.

Dans certains cas, dépendants de la quantité d'AGCM ingérés et de la durée du régime, une forte β -oxydation peut conduire à une concentration d'acétyl-CoA trop importante par rapport à la quantité d'acide oxaloacétique disponible, nécessaire pour l'oxydation dans le cycle de Krebs. Dans ces cas, il a été décrit que l'acétyl-CoA est utilisé pour la production de corps cétoniques (utilisables dans le cœur et le cerveau) (Pégorier et al., 1988; Tsuji et al., 2001; Van Wymelbeke et al., 2001) ou pour la synthèse *de novo* d'AGCL (Christensen et al., 1989). Une augmentation de la lipogenèse dans le foie a effectivement été observée, due à la

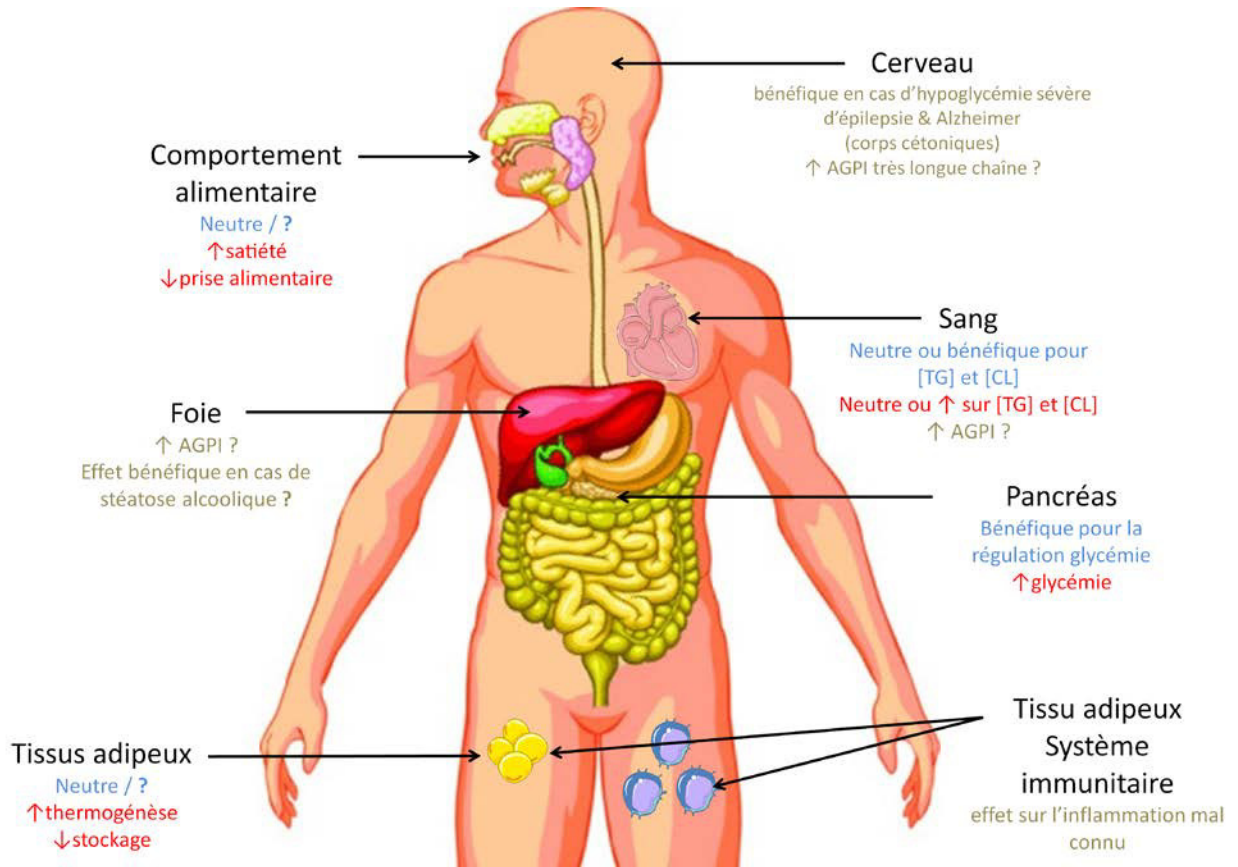


Figure 4. Effets physiologiques des AGCM selon l'organe et la dose consommée

En bleu : Effet avec une dose modérée ; en rouge : dose élevée ; en gris : effet indépendant de la dose

synthèse *de novo* d'AGCL, suite à une consommation de régime contenant 40 % en masse de TCM (Carnielli et al., 1994; Hill et al., 1990).

1.5. Utilisation cellulaire des AGCM dans les tissus périphériques

Etant donné l'importance quantitative du captage hépatique des AGCM, leur rôle sur les autres organes est minime, excepté pour l'utilisation des corps cétoniques dans le cerveau et le cœur (Bach et al., 1980). Cependant, lorsqu'ils sont ingérés en quantité importante, une faible part des AGCM peut suivre la voie classique des AGCL dans les entérocytes, ou échapper au catabolisme hépatique et atteindre les tissus périphériques. Mais, à l'instar du foie, les autres organes incorporent peu les AGCM et ceux-ci sont β -oxydés dans les mitochondries (indépendamment du système carnitine-acylcarnitine). Ainsi, chez le nourrisson recevant une formule infantile commerciale contenant plus de 30 % de C8:0 (Sarda et al., 1987) ou chez le rat nourri pendant 6 semaines avec des régimes hyperlipidiques à base d'huile TCM (46.8 % des AET) (Han et al., 2003), seule une très faible quantité d'AGCM est retrouvée dans les tissus adipeux. Lorsque des TCM radiomarqués sont administrés par voie intraveineuse chez le rat, 90 % de la radioactivité est retrouvée dans le CO₂ expiré après 24 h (Johnson et al., 1990), preuve que le catabolisme des AGCM est important dans les tissus périphériques. Les AGCM peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et être oxydés dans le cerveau (Ebert et al., 2003).

2. Effets physiologiques et intérêts thérapeutiques des AGCM

La consommation des AGCM entraîne des effets physiologiques liés à leurs caractéristiques métaboliques (c'est-à-dire hydrolyse gastro-intestinale rapide, absorption précoce et transport spécifique dans la veine porte jusqu'au foie où ils sont β -oxydés) (**Figure 4**). Certains des effets qui ont été associés aux AGCM sont néanmoins sujets à controverse.

2.1. Effets des AGCM sur certains paramètres plasmatiques

2.1.1. Effets sur la lipidémie plasmatique

Les lipides sont sécrétés dans la circulation générale sous forme de chylomicrons par les cellules intestinales et sous forme de lipoprotéines de très faible densité (VLDL, pour very low density lipoprotein) par le foie. Les chylomicrons et les VLDL présentent respectivement à leur surface les apoprotéines (apo) B48 et B100. Il a été montré que la surconsommation d'acides gras saturés (notamment le C16:0) entraîne une augmentation du taux plasmatique de cholestérol, et plus particulièrement du cholestérol associé aux LDL (Caggiula et al., 1997; Hu et al., 1999; Nicolosi, 1997). Une lipidémie plasmatique élevée, en association à d'autres facteurs de risque (predisposition génétique, hypertension, sédentarité ou obésité), favorise l'apparition de plaques d'athérome qui augmentent les risques d'accidents cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral).

Des études *in vitro*, réalisées sur des hépatocytes de poulet, ont montré que le C8:0 et le C10:0, comparés au C16:0, stimulent moins la sécrétion d'apoB, de triglycérides et de cholestérol, en réduisant l'expression génique de l'apoB100, mais sans augmenter la concentration en triglycérides dans les cellules (Sato et al., 2005; Tachibana et al., 2005). Cependant, ces études ont été réalisées avec des doses très élevées de C8:0 et C10:0 (1 à 1,2 mM) en comparaison de contrôles contenant six fois moins de C16:0 (0,2 mM). Par conséquent, un effet de cytotoxicité masquant le véritable effet des AGCM ne peut être exclu. Néanmoins, une étude réalisée chez la souris a aussi conclu que l'acide octanoïque, comparé aux acides oléique et linoléique, diminue la sécrétion d'apoB100 dans le sang ainsi que la triglycéridémie et la cholestérolémie hépatiques (Xie et al., 2002).

Chez l'Homme, des études ayant examiné les effets d'un apport modéré en AGCM (5 à 10 g/jour) en comparaison de TCL (AGMI et AGPI) sur les lipides circulants ont rapporté une légère diminution des taux de cholestérol LDL et HDL chez des sujets sains pendant 12 semaines (Nosaka et al., 2003) et chez des femmes obèses en restriction calorique forte (580 kcal/jour) pendant 4 semaines (Krotkiewski, 2001). Plus récemment, une étude chez des obèses présentant une résistance à l'insuline a montré un effet neutre d'une supplémentation

de courte durée en TCM (4 semaines, 20 g/jour) sur la sécrétion de lipoprotéines (apoB48 et B100) (Tremblay et al., 2014).

Les effets de hautes doses de TCM (entre 40 et 60 g/jour) ont également été étudiés chez l'Homme sain ou obèse. Plusieurs études ont montré que les régimes riches en TCM augmentaient la cholestérolémie et la triglycéridémie chez l'Homme à jeun (Cater et al., 1997; Hill et al., 1989, 1990; Tholstrup et al., 2004; van Schalkwijk et al., 2014), en comparaison de régimes riches en TCL. Cependant, les TCL utilisés dans ces études étaient majoritairement des AGPI, connus pour leurs effets hypocholestérolémiants et hypo-triglycéridémiants (Mensink et al., 2003). De plus, les régimes TCM contenaient parfois un apport en AGPI essentiels *quasi* nul. Quand un régime enrichi en TCM est comparé avec un régime riche en acide laurique (C12:0), avec des quantités identiques d'AGMI et d'AGPI dans les deux régimes, le taux de cholestérol LDL augmente moins avec les TCM (Tsai et al., 1999). Un effet neutre des TCM (40 g/jour) a été observé dans une autre étude sur la cholestérolémie en comparaison de régimes contenant des TCL (AGMI et AGPI), chez 11 hommes sains pendant 4 semaines (Nosaka et al., 2002). Chez des femmes obèses en bonne santé, la consommation d'huile TCM (20% de l'AET) associée à de l'huile de poisson contenant des ω 3 en comparaison d'un régime TCL et ω 3, a diminué la cholestérolémie (totale et LDL), sans modifier les taux plasmatiques de cholestérol HDL et de triglycérides (Bourque et al., 2003).

En conclusion, les AGCM apportés en quantité modérée (< à 10% de l'AET) chez l'Homme exercent un effet neutre ou bénéfique sur la cholestérolémie et la triglycéridémie. Quand ils sont apportés en quantité très importante dans le régime alimentaire (> à 35% de l'AET), les AGCM peuvent cependant augmenter la cholestérolémie et la triglycéridémie (Cater et al., 1997; McGandy et al., 1970; Swift et al., 1992; Tholstrup et al., 2004). Il est important de préciser que la consommation d'AGCM à dose classique (< 2% de l'AET) n'a jamais été significativement associée à l'augmentation des risques de maladies cardiovasculaires (Astrup et al., 2011; Hegsted et al., 1965; Hu et al., 1999).

2.1.2. Effets sur l'homéostasie du glucose

Un apport trop élevé en certains acides gras peut entraîner une résistance à l'insuline et conduire à l'apparition du diabète. Il a été montré que les AGCM améliorent la sensibilité à

l'insuline *in vitro* et *in vivo*, chez l'animal (Han et al., 2003; Takeuchi et al., 2006; Wein et al., 2009) et chez l'Homme, généralement lorsqu'ils sont consommés à des doses modérées (10 à 20 g/jour) (Airhart et al., 2015; Eckel et al., 1992; Han et al., 2007; Krotkiewski, 2001). Chez des nourrissons prématurés de faible poids de naissance souffrant d'hypoglycémie, l'ingestion de TCM augmente la production de corps cétoniques, la synthèse de glucose et permet une meilleure régulation de la glycémie (Bougnères et al., 1989). Les AGCM offrent ainsi un avantage thérapeutique qui est de préserver les fonctions cérébrales dans des conditions d'hypoglycémie, grâce à la production de corps cétoniques (Page et al., 2009). Quelques études chez l'Homme ont cependant montré que la consommation d'AGCM pouvait entraîner une augmentation de la glycémie, mais avec des doses d'acides gras très élevées (70 g/jour) (Tholstrup et al., 2004). L'effet des AGCM sur la résistance à l'insuline pourrait s'expliquer par un effet stimulateur sur la sécrétion d'adiponectine, une adipocytokine capable d'améliorer la sensibilité à l'insuline (Takeuchi et al., 2006).

2.2. Effets des AGCM sur l'homéostasie énergétique

2.2.1. Effets sur le stockage des lipides et la prise de poids

La quantité et le type de lipides consommés influencent la mise en réserve des graisses. Un stockage des graisses plus faible a été mesuré chez des rats adultes suralimentés avec des régimes TCM (entre 33 et 63% de l'AET, pendant 6 semaines) en comparaison de régimes TCL (Baba et al., 1987; Crozier et al., 1987; Geliebter et al., 1983; Han et al., 2003), parfois accompagné d'une diminution du diamètre moyen des adipocytes (Baba et al., 1987; Geliebter et al., 1983; Lavau et al., 1978). Chez l'Homme sain ou en surpoids, la consommation de régimes TCM diminue également le stockage des graisses en comparaison de régimes iso-énergétiques riches en TCL (St-Onge et al., 2002, 2003a, 2008; Tsuji et al., 2001).

Cet effet des AGCM s'explique par l'augmentation de la thermogénèse (Westterterp, 2004), due à la forte oxydation de ces acides gras, ce qui augmente la consommation en O₂ ainsi que la dissipation d'énergie sous forme de chaleur et diminue la mise en réserve des lipides dans les tissus adipeux et donc, la prise de poids (Bach et al., 1996; Hashim et al., 1987; Van Wymelbeke et al., 2001). De plus, il semblerait que la consommation de régimes

TCM exerce un effet inhibiteur sur la lipoprotéine lipase (LPL) dont la fonction est d'hydrolyser les triglycérides des chylomicrons et des VLDL avant leur entrée dans les adipocytes (Han et al., 2003; Papamandjaris et al., 1998; Takeuchi et al., 2006; Turkenkopf et al., 1982; Xie et al., 2002)

Cependant, l'utilité réelle de la consommation des TCM pour contrôler la masse corporelle reste un sujet de controverse (Bach et al., 1980; Shinohara et al., 2005, 2006; Yaqoob et al., 1995). Il semblerait que l'apport en AGCM doive excéder 50% de l'AET chez l'Homme pour entraîner une réelle perte de poids (Bach et al., 1996). Une méta-analyse, s'intéressant aux effets des AGCM sur la masse corporelle chez le rat, a conclu à l'existence d'un effet de réduction à court terme (3-4 semaines), qui n'est plus observé dans les études à plus long terme (8-10 semaines). Cela est potentiellement dû à une adaptation aux nouvelles conditions métaboliques (Ferreira et al., 2014). En conclusion, bien qu'un grand nombre d'études laisse penser que la consommation d'AGCM réduit le stockage des graisses et favorise la perte de poids en comparaison d'AGCL, de nouvelles études sont nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse (Mumme et al., 2015). L'âge, l'espèce, la durée et la composition (protéines, glucides, AGPI) des régimes TCM et des régimes contrôles sont autant de paramètres qui peuvent moduler l'effet des AGCM.

2.2.2. Effets sur la satiété et la prise alimentaire

La structure des lipides ingérés influence leur lipolyse et leur absorption dans le système digestif, ce qui affecte la lipidémie postprandiale, la sécrétion de certaines hormones anorexigènes ainsi que la satiété (Ohlsson et al., 2014). Des études ont montré un effet satiétogène des AGCM plus important que celui observé avec des AGCL chez l'animal (Friedman et al., 1983) et l'Homme (St-Onge et al., 2003c; Stubbs et al., 1996; Van Wymelbeke et al., 1998). Il a ainsi été constaté qu'un apport en TCM, 30 min avant un repas, réduisait la consommation alimentaire durant ce repas plus fortement qu'un apport en TCL (Rolls et al., 1988). De même, un petit déjeuner riche en TCM entraîne une consommation calorique plus faible au repas suivant (4 h après), comparé à un petit déjeuner riche en acide oléique (Van Wymelbeke et al., 1998, 2001). La consommation d'AGCM influence également l'intervalle de temps s'écoulant entre les repas, en raison de la forte oxydation des

lipides dans le foie, consécutive à l'ingestion de TCM (Jambor de Sousa et al., 2006; Langhans, 1996). Le mode d'administration des AGCM joue un rôle important sur la satiété puisque leur effet est observé après une ingestion orale, mais pas s'ils sont infusés directement dans l'estomac (Maggio et al., 1982) ou le duodénum (Matzinger et al., 2000).

Cependant, de nombreuses études ont montré un effet neutre des AGCM sur la satiété et plus rarement, une augmentation de la prise alimentaire (Ferreira et al., 2014). Il semble que seule une dose élevée d'AGCM augmente la sensation de satiété (Samra, 2010) et que cet effet décline avec le temps.

2.3. Propriétés des AGCM sur l'immunologie

2.3.1. Effets sur l'inflammation chronique

L'inflammation chronique (de bas grade) est considérée comme un des facteurs responsables de l'athérosclérose et de l'augmentation du risque de maladies cardiovasculaires. A forte dose, les acides gras alimentaires peuvent avoir une influence sur les facteurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 (interleukine 1), IL-6, IL-8, TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) ou la CRP (protéine C-réactive). En excès, les AGCL (saturés, $\omega 6$) peuvent favoriser l'expression de marqueurs de l'inflammation (Marchix et al., 2015). Les AGPI de la famille des $\omega 3$ sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires (Plat et al., 2005).

Une étude *in vitro* a montré un effet pro-inflammatoire (activation des neutrophiles) d'émulsions de tri-C6:0 et de tri-C8:0, mais pas d'effet pour une émulsion de tri-C10:0 ni pour les C6:0, C8:0 et C10:0 non estérifiés (Wanten et al., 2002). D'autres études *in vitro* ont observé des résultats différents avec des cellules Caco-2 intestinales : une sécrétion accrue d'IL-8 et d'IL-1 en présence de C10:0 dans le milieu de culture, comparé à de l'acide oléique (C18:1 n-9), de l'EPA et du DHA (Andoh et al., 2000; Tanaka et al., 2001) et une diminution de la sécrétion d'IL-8 en présence de C8:0 et de TCM (Hoshimoto et al., 2002). Plus récemment, des études *in vivo* réalisées chez la souris ont montré une diminution de la réponse immunitaire après un stress endotoxique (IL-6 et TNF- α plus faible), après 12 semaines de régime riche en TCM (10% de TCM en masse ou 7,5% de TCM associé à 3% d'huile de poisson, en masse) en comparaison de régime TCL (avec ou sans huile de poisson)

(Carlson et al., 2015), et une diminution de la réponse immunitaire (IL-6 plus faible et IL-10 plus élevé) après 12 semaines d'un régime hyperlipidique (20% de lipides en masse) contenant des TCM (17% en masse) en comparaison d'un régime hyperlipidique sans TCM (Geng et al., 2015). En revanche, une étude épidémiologique chez 4029 femmes ménopausées a conclu à une corrélation entre la consommation d'acides gras à chaîne courte et moyenne (1,3% de l'AET, mais avec le C12:0 inclus dans les AGCM) et le raccourcissement de la longueur des télomères dans les leucocytes, suggérant un effet pro-inflammatoire de ces acides gras (Song et al., 2013). Les effets des AGCM sur la réaction inflammatoire, chez l'animal ou l'Homme, ne sont pas encore bien connus (Olthof et al., 2015). Or, l'utilisation des AGCM en nutrition clinique chez des patients au système immunitaire fragilisé (maladie de Crohn ou syndrome de l'intestin court), rend d'autant plus importante la clarification de ce point. L'action des AGCM sur l'inflammation pourrait être liée à leur effet sur le tissu adipeux sécrétant des cytokines, ou à leur fixation sur certains récepteurs tels que GPR84 (Suzuki et al., 2013) et PPAR γ/α (Liberato et al., 2012; Malapaka et al., 2012).

2.3.2. Propriétés antivirales et antibactériennes

Les acides gras libres (AGL) sont connus pour leur capacité à inhiber la croissance ou même tuer les bactéries et les virus (Kabara et al., 1972). Même si le mécanisme d'action des AGL sur les bactéries est mal connu, il semblerait qu'ils agissent en perturbant le transfert d'électrons de la chaîne respiratoire, l'absorption des nutriments et l'activité de certaines enzymes (Desbois et al., 2010). Ainsi, les AGCM inhibent la croissance de certaines bactéries, comme par exemple *Escherichia coli* (pour une concentration de 20-40 mM) (Huang et al., 2011; Royce et al., 2013). Pour les virus, les AGCM libres ou sous forme de monoglycérides altèrent l'enveloppe virale et provoquent sa désintégration à fortes concentrations (Isaacs et al., 1994). Dans la plupart des études testant les effets antibactériens et antiviraux des AGL, le C10:0 est l'acide gras le plus efficace. Le C8:0 possède un spectre d'action moins large que le C10:0, mais exerce néanmoins des effets antibactériens (gram positive) (Galbraith et al., 1971), antiviraux (Thormar et al., 1987), antifongiques (McGrattan et al., 1976) et antiprotozoaires (Dohme et al., 2001). La libération des AGCM estérifiés dans les triglycérides laitiers, lors de la digestion, joue un rôle protecteur et pourrait prévenir des risques d'infections gastro-intestinales, comme cela a été démontré chez des adultes

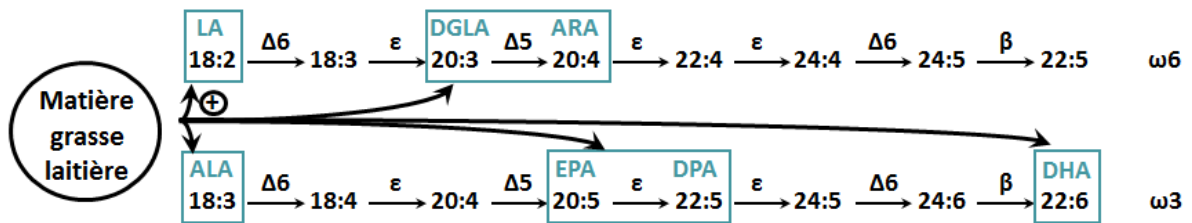


Figure 5. Protection contre la β -oxydation des précurseurs alimentaires et de leurs dérivés par la matière grasse laitière [acides gras encadrés]

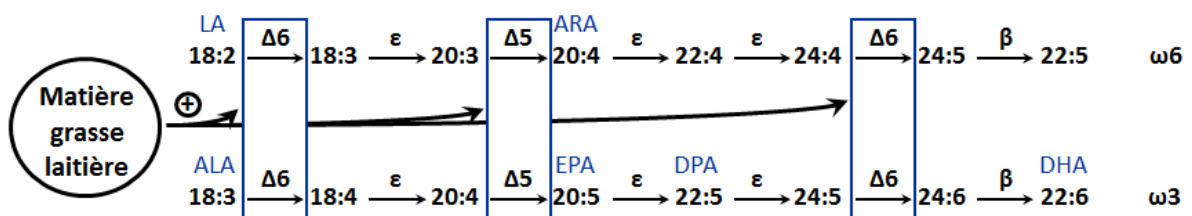


Figure 6. Augmentation de l'activité des désaturases par la matrice grasse laitière, notamment par l'acide myristique [enzymes encadrées]

consommant du lait et chez des nourrissons nourris avec des formules infantiles riches en TCM.

2.4. Effets des AGCM alimentaires sur la disponibilité cellulaire en AGPI

Dans les pays occidentaux, les régimes alimentaires se sont appauvris, depuis le début du 20^{ème} siècle, en acides gras essentiels à chaîne longue de la famille des ω 3 (acides α -linoléinique (ALA), eicosapentaénoïque (EPA), docosahexaénoïque (DHA)). Ces AGPI, indispensables au fonctionnement du système nerveux, ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par le régime alimentaire, mais les sources en ω 3 à très longue chaîne sont limitées (œufs, poissons gras, noix). Il semblerait que la consommation d'AGCM puisse augmenter la disponibilité en AGPI dans certains tissus (**Figures 5 et 6**). En effet, il a été rapporté que dans un régime, la substitution d'huile d'olive par de la matière grasse laitière, contenant des AGCM et des AGCC, augmente la concentration d'ALA dans le tissu adipeux, le plasma et le foie, la concentration d'EPA dans le tissu adipeux et les globules rouges, ainsi que la concentration en acide docosapentaénoïque (DPA) dans le foie, le cœur et la rétine, chez le rat (Legrand et al., 2010). En outre, chez des rats déficients en ALA au sevrage, il a été montré qu'un régime avec une base lipidique d'origine laitière (AGCC et AGCM à hauteur de 6,1 % des AGT) augmentait plus efficacement la concentration en DHA dans le cerveau qu'un régime similaire avec une base d'huile de palme (sans AGCC et AGCM, mais avec 36,2 % d'acide palmitique) (Delplanque et al., 2013; Du et al., 2012). Il a aussi été observé que le plasma de rats mâles, issus de mères supplémentées avec de la matière grasse laitière, était plus enrichi en DHA comparé à des rats mâles, issus de mères ayant été supplémentées avec de l'huile d'olive et de la margarine (Priego et al., 2013). Ces études suggèrent donc un effet des AGCC et des AGCM d'origine laitière sur la préservation des polyinsaturés. Il a été montré que 60 à 85 % de l'ALA d'origine alimentaire sont directement β -oxydés (Cunnane et al., 1997) mais la présence d'AGCM, qui sont des substrats préférentiels de la β -oxydation, pourrait diminuer la part d'ALA catabolisée et permettre une meilleure conversion en DHA (Ezanno et al., 2014).

De plus, une supplémentation avec 0,12 % de DHA et 1,5 % de ALA dans un régime contenant de l'huile de palme, chez de jeunes rats déficients en ALA, entraîne une augmentation du DHA dans le cerveau plus faible qu'un régime à base de matière grasse laitière contenant 1,5 % d'ALA, mais sans DHA (Du et al., 2012). Ce résultat suggère un mécanisme potentiel des AGCM et AGCC permettant l'accumulation de DHA dans le cerveau des rats.

2.5. Exemples d'utilisations thérapeutiques des AGCM

2.5.1. Intérêts dans le cas de pathologies nutritionnelles

Depuis plusieurs dizaines d'années, les AGCM sont utilisés en nutrition clinique lorsque la digestion, l'absorption, le transport ou le métabolisme (transport dans les mitochondries, β -oxydation) des lipides sont altérés (Bach et al., 1982). Leur consommation, en comparaison d'AGCL, permet d'améliorer rapidement l'absorption des lipides, de diminuer la stéatorrhée et de limiter la dénutrition favorisant ainsi une prise de poids ou une reprise de croissance, chez les nourrissons et les enfants (Ball, 1993). La consommation d'AGCM peut être bénéfique :

- pour des pathologies créant une insuffisance pancréatique (pancréatite, obstruction des canaux pancréatiques par une tumeur, mucoviscidose) (Bach et al., 1982; Caliari et al., 1996)
- suite à l'ablation partielle du pancréas, de l'estomac ou de l'intestin qui peut entraîner l'apparition du syndrome de l'intestin court (Jeppesen et al., 1998)
- pour d'autres pathologies telles que l'ictère, l'hyperchylomicronémie (excès de graisse dans le sang dû à un excès de chylomicrons) ou la maladie de Crohn.

2.5.2. Intérêts dans d'autres pathologies

La consommation d'AGCM, en accompagnement d'un traitement adapté, peut aussi se révéler bénéfique pour diverses pathologies n'affectant pas directement la digestion. Il a par exemple été observé que les AGCM peuvent être avantageux pour les patients souffrant de maladies cardiaques (Labarthe et al., 2008). D'autre part, la production de corps cétoniques, consécutive à la consommation d'AGCM, semble profitable dans le cadre d'un traitement de

la maladie d'Alzheimer (Fernando et al., 2015) ou pour certains désordres neurologiques (Gano et al., 2014), en alternative aux régimes céto-gènes.

La consommation d'AGCM peut également freiner l'apparition d'une stéatose hépatique alcoolique. En effet, il a été observé chez le rat que la consommation de TCM, à hauteur de 30% de l'AET, en comparaison de TCL, limite l'accumulation hépatique de lipides (Li et al., 2013) en évitant l'inhibition de l'apoB provoquée par l'alcool et en activant MTP et SCD1 (Stearoyl-CoA desaturase-1) (Li et al., 2013). L'expression protéique du facteur nucléaire hépatique 4 α (HNF4 α), inhibée par l'alcool, est également régulée lorsque les TCM sont ingérés. Ainsi, la consommation de TCM favorise la sécrétion des lipides hépatiques dans le plasma, vers les organes périphériques.

Parce que les AGCM ne stimulent pas le flux de lymphes, contrairement aux AGCL, les régimes TCM peuvent être utilisés en cas de chylothorax, c'est-à-dire l'épanchement de liquide lymphatique dans la cavité pleurale, provoqué le plus souvent par une compression du canal thoracique qui entraîne une accumulation de chylomicrons et de lipides dans le liquide pleural (Sendama et al., 2015).

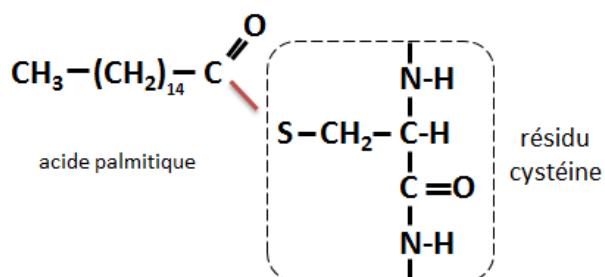
2.5.3. Effets secondaires d'un excès d'AGCM

Même si certaines études ont constaté une toxicité du C8:0 administré par voie intraveineuse à forte dose chez la souris et le chien, entraînant dans un cas extrême le coma (McCandless, 1985; Miles et al., 1991), des études ultérieures n'ont montré aucune toxicité des AGCM (par voie orale ou veineuse) chez l'animal et l'Homme (Traul et al., 2000). Ainsi, un apport de 25 à 30 g/repas de TCM est très bien toléré chez l'Homme (Traul et al., 2000). Cependant, il est vrai qu'un apport trop élevé pendant un repas peut provoquer certains effets secondaires au niveau digestif, notamment des nausées, des vomissements, des crampes d'estomac et de la diarrhée (Marten et al., 2006; Van Wymelbeke et al., 2001).

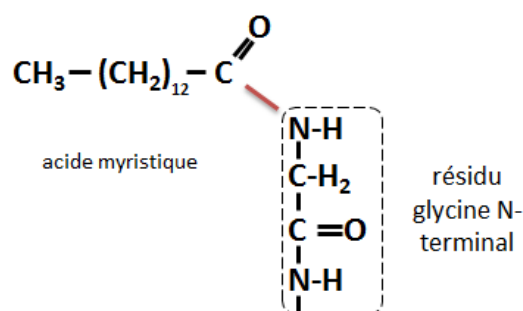
3. Octanoylation de la ghréline : effets et régulations

Dans les années 2000, il a été découvert que l'acide octanoïque (C8:0) est capable de se lier de manière covalente à une unique hormone peptidique, la ghréline (Kojima et al., 1999).

S-acylation (Palmitoylation) : liaison thioester



N-myristoylation : liaison amide



O-acylation (Octanoylation) : liaison oxyester

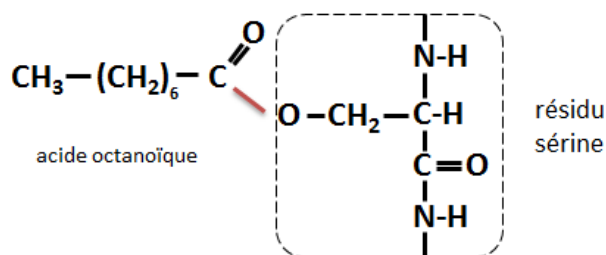


Figure 7. Classification des différents types d'acylations de protéines

La palmitoylation (S-acylation) est la formation d'une liaison thioester réversible généralement entre un acide palmitique (C16:0) et un résidu cystéine interne d'une protéine. La myristoylation N-terminale désigne la formation d'une liaison amide covalente entre un acide myristique (C14:0) et une glycine N-terminale de protéines eucaryotes et virales. L'octanoylation (O-acylation) correspond à la formation d'une liaison oxyester entre un acide octanoïque (C8:0) et la sérine interne (Ser₃) de la ghréline.

L'octanoylation de la ghréline, catalysée par la Ghréline O-Acyltransférase (GOAT) (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008a), est nécessaire à sa reconnaissance par le récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHSR-1a). Il s'agit d'un cas unique d'activation d'hormone par une lipodation qui ajoute un niveau de complexité à la compréhension des effets physiologiques des AGCM.

3.1. L'acylation des protéines

3.1.1. Généralités sur les modifications de protéines par des lipides

Dans la cellule, les protéines peuvent subir de nombreuses modifications co- ou post-traductionnelles. L'addition de certains groupes fonctionnels (méthylation, biotinylation, glycosylation, phosphorylation) ou de groupes peptidiques (ubiquitination, sumoylation) affecte les propriétés et la structure des protéines. Les lipodations, ou modifications covalentes de protéines par des lipides, sont caractérisées par le type de lipide qui se lie à la protéine, la nature de la liaison mise en jeu et le site de liaison à la protéine. On peut distinguer quatre types principaux de lipodation (Nadolski et al., 2007) :

- La **glypiation** correspond à la formation irréversible d'une liaison amide entre un groupement glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) et l'acide aminé C-terminal de certaines protéines. Cette modification est post-traductionnelle et est impliquée dans l'ancrage de protéines vers la face extérieure de la membrane (Nosjean et al., 1997).
- L'**isoprénylation** est la formation d'une liaison thioéther entre un isoprène (farnésyl, géranylgeranyl) et une cystéine C-terminale. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle et irréversible, impliquée dans l'ancrage des protéines à la membrane et dans certaines interactions protéines-protéines (McTaggart, 2005).
- La **cholestéroylation** correspond à l'estérification d'une molécule de cholestérol avec une glycine C-terminale (Mann et al., 2000).
- L'**acylation** est la modification covalente de protéines par des acides gras, majoritairement saturés, avec une longueur de chaîne variable. Il en existe trois types : la S-acylation, la N-acylation et la O-acylation (Resh, 1999; Yang et al., 2008a).

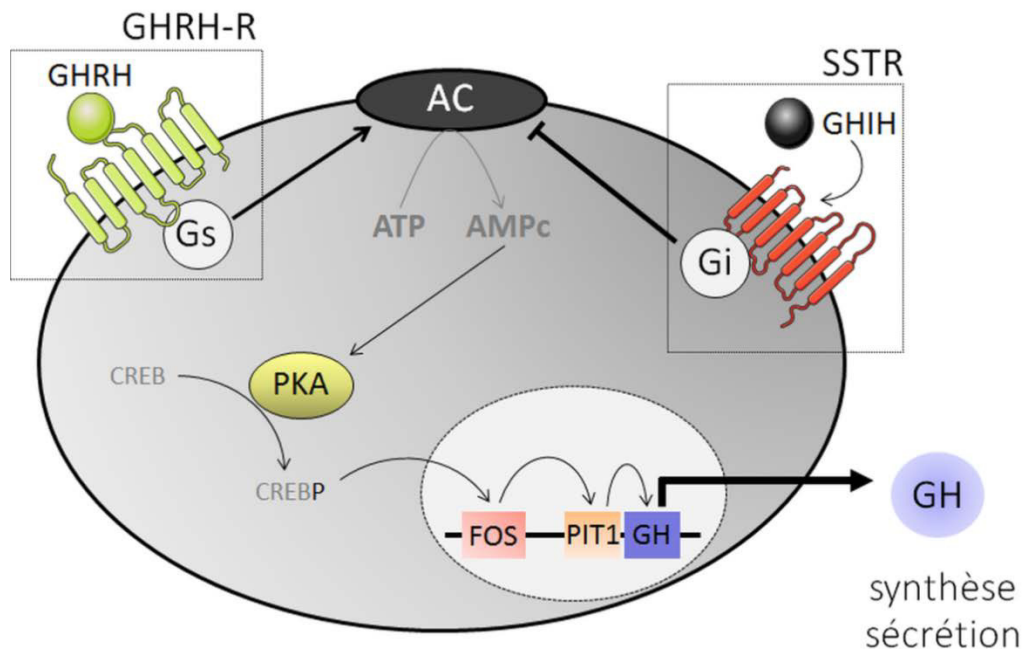


Figure 8. Sécrétion de GH déclenchée par le récepteur GHRH-R

La fixation de la GHRH (GH releasing hormone) au niveau de son récepteur, le GHRH-R (GHRH receptor) dans les cellules somatotropes active l'adénylate cyclase (AC) qui va augmenter la concentration cellulaire d'AMP_c. L'augmentation de AMP_c active la protéine kinase A (PKA) qui phosphoryle CREB (C-AMP Response Element-binding protein) en CREBP. CREBP déclenche la transcription de FOS et PIT1 (POU domain, class 1, transcription factor 1), des facteurs de transcription de la GH. La fixation de la somatostatine (GHIH, growth hormone-inhibiting hormone) sur les récepteurs SSTR1 à SSTR5 inhibe l'AC et donc la sécrétion de GH.

3.1.2. Acylation des protéines par des acides gras saturés

Les acides gras saturés (AGS) qui acylent les protéines sont principalement le C16:0, le C14:0, le C12:0 et le C8:0. En fonction du type d'acylation, la localisation subcellulaire, les interactions avec d'autres protéines ou avec la membrane et l'activation de la protéine diffèrent (**Figure 7**). Les AGS manifestent ainsi un rôle émergent de modulation des fonctions protéiques (Ezanno et al., 2013).

- La **S-acylation**, ou palmitoylation, est la formation d'une liaison thioester entre une cystéine interne et un AGS, majoritairement le C16:0 et, parfois, le C12:0 et le C14:0. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle réversible qui touche les protéines périphériques et internes à la membrane plasmique (Dietrich et al., 2004). Le caractère réversible de cette liaison permet une régulation de la localisation subcellulaire de la protéine. L'ajout de C16:0 permet l'association de la protéine avec la membrane, le trafic protéique, la fusion de vésicules (Mitchell et al., 2006), la transduction de signaux (Rioux et al., 2007) et affecte la stabilité protéique.
- La **N-acylation**, ou myristoylation, est la formation d'une liaison amide entre un C14:0 et une glycine N-terminale (Beauchamp et al., 2009). D'autres acides gras peuvent également participer à la N-acylation : c'est le cas du C16:0 qui est d'abord lié à une cystéine par une liaison thioester réarrangée en liaison amide stable (Linder et al., 2007). La myristoylation peut être cotraductionnelle ou post-traductionnelle dans les cellules en apoptose (Farazi et al., 2001; Martin et al., 2011), et permet de moduler l'ancrage de la protéine dans la membrane, l'adressage subcellulaire et les interactions protéines-protéines.
- L'**O-acylation** est la formation réversible d'une liaison oxyester entre un AGS et un résidu sérine interne. La nature de l'acide gras est variable : cela peut être du C16:0 ou, comme découvert plus récemment, du C8:0. La seule protéine octanoylée connue est la ghréline, une hormone peptidique pléiotrope. L'octanoylation est nécessaire pour conférer à la ghréline son activité biologique (Kojima et al., 1999; Yang et al., 2008a).

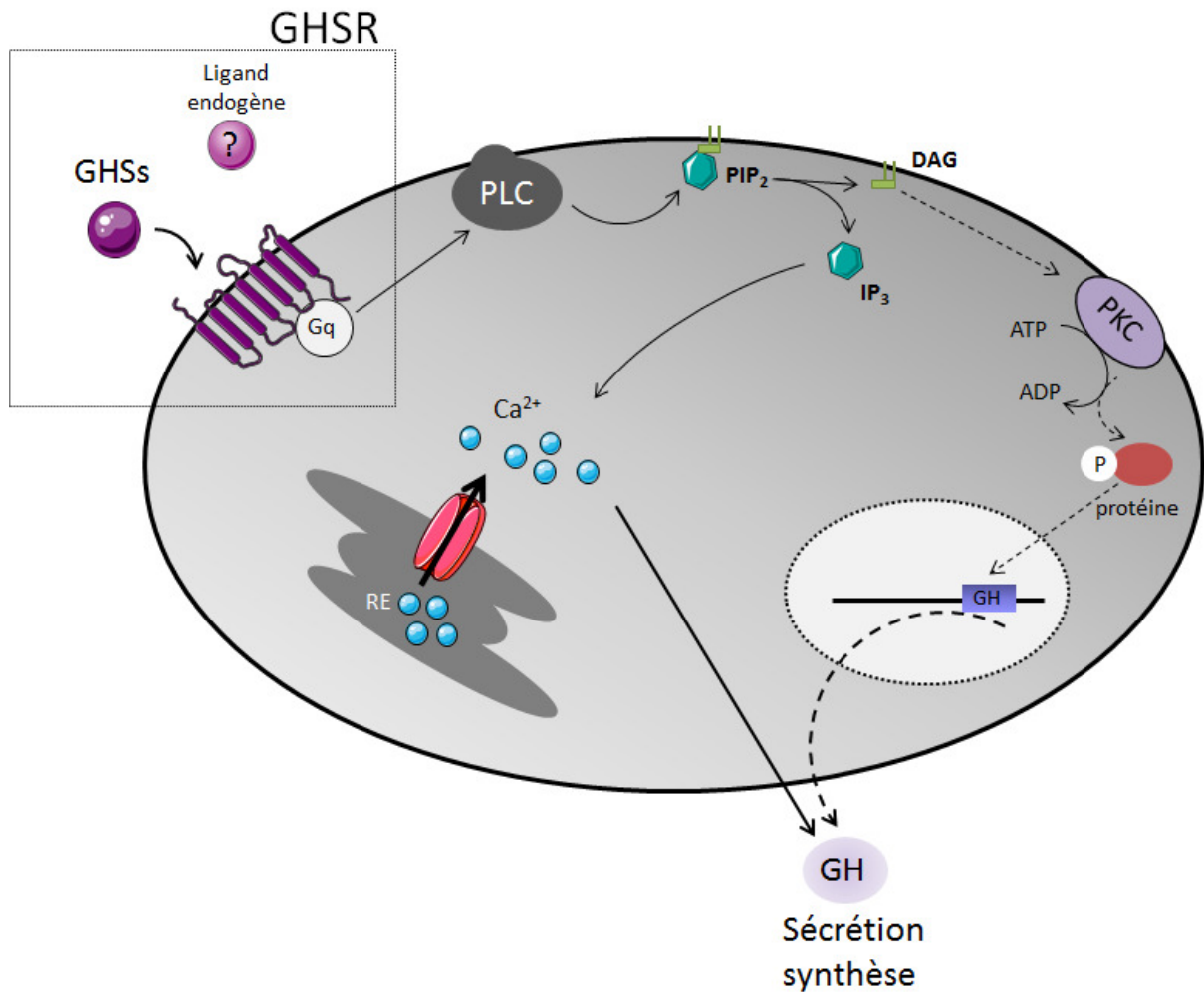


Figure 9. Sécrétion de GH déclenchée par le récepteur orphelin GHSR

La fixation des GHSs (GH secretagogues) au niveau du récepteur GHSR (GHS receptor) dans les cellules somatotropes active la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en diglycérine (DAG) et en inositol triphosphate (IP₃). La libération d'IP₃ entraîne l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ce qui va déclencher la sécrétion de GH. La présence de DAG dans la membrane va activer la protéine kinase C (PKC) qui phosphoryle alors certaines protéines capables de déclencher la transcription de GH et sa sécrétion.

3.2. Fonctionnement de l'axe ghréline-GOAT-GHSR-1a

3.2.1. Découverte de la ghréline

3.2.1.1. Identification d'un récepteur orphelin secretagogue de la GH

L'hormone de croissance (GH, growth hormone) est sécrétée par les cellules somatotropes hypophysaires, après fixation de la GHRH (GH releasing hormone) sur le récepteur GHRH-R (GH releasing hormone receptor) (**Figure 8**). La fixation de la GHRH sur son récepteur active l'adénylate cyclase (AC), augmentant ainsi la concentration cellulaire en AMPc, ce qui active la protéine kinase A (PKA) et entraîne la transcription de la GH *via* CREB (C-AMP Response Element-binding protein) et les facteurs de transcription FOS et PIT1 (POU domain, class 1, transcription factor 1). La synthèse et la sécrétion de la GH sont inhibées par la fixation de la somatostatine (GHIH, growth hormone-inhibiting hormone) sur les récepteurs SSTR1 à SSTR5, couplés aux protéines G.

En 1976, Bowers observe que des dérivés opiacés peptidiques entraînent la sécrétion de GH et nomme ces peptides les GHSs (growth hormone secretagogues) (Bowers et al., 1980). Les GHSs agissent via un récepteur différent de celui de la GHRH, le récepteur GHSR (growth hormone secretagogue receptor) couplé aux protéines G (Howard et al., 1996). La fixation des dérivés opiacés sur ce récepteur entraîne une augmentation du calcium intracellulaire *via* l'activation de la phospholipase kinase et le second messenger IP₃ (Inositol 1,4,5-trisphosphate) (**Figure 9**). Le récepteur GHSR, exprimé principalement dans l'hypothalamus, l'hypophyse et l'hippocampe (Guan et al., 1997), n'a alors pas de ligand naturel connu et la recherche de ce dernier commence (Bennett et al., 1997).

3.2.1.2. Identification du ligand endogène du récepteur GHSR-1a

Cette recherche du ligand endogène du récepteur GHSR va durer 20 ans. Le récepteur GHSR est rapidement cloné (Howard et al., 1996) et l'adénosine hypothalamique est identifiée comme un ligand endogène, mais ne stimulant pas la sécrétion de GH. Remarquant les homologies entre le récepteur GHSR et le récepteur de la motiline (44 % d'homologie dans la séquence d'acides aminés (Folwaczny et al., 2001)), un peptide gastro-intestinal, une équipe japonaise entreprend une démarche systématique de purification de peptides du système digestif dans le but de tester l'efficacité de ces peptides à entraîner une augmentation

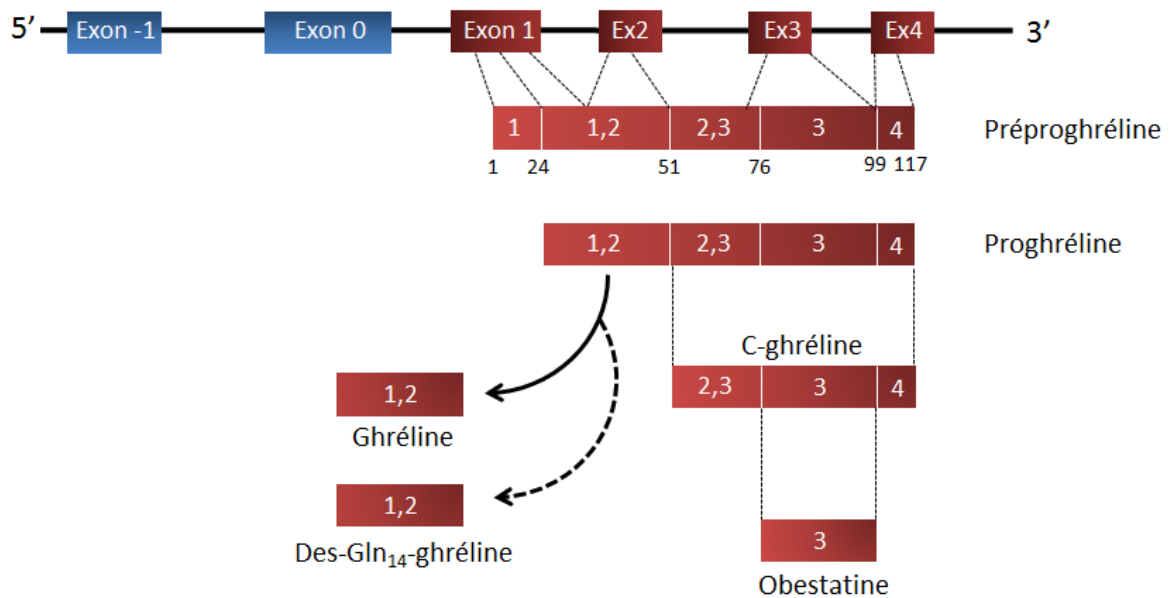


Figure 10. Structure du gène *Ghrl* codant pour la ghréline et ses dérivés

La séquence du gène *Ghrl* est constituée de deux exons non codants (-1 et 0) et quatre exons codants (1, 2, 3 et 4). Les exons 1 et 2 codent pour la ghréline (Homme et rongeur) et la des-Gln-14-ghréline (rongeur, ovin et bovin). Les codons 2, 3 et 4 codent pour la C-ghréline, le codon 3 pour l'obestatine.

de la concentration en calcium dans des cellules surexprimant le récepteur GHSR. Un peptide de 28 acides aminés, nommé motilin-like related-peptide puis ghréline, est finalement identifié à partir d'extraits gastriques, comme ligand endogène du récepteur GHSR (Kojima et al., 1999). Mais le peptide synthétique correspondant est inactif. Remarquant que la masse moléculaire du peptide synthétique est inférieure à celle du peptide endogène purifié et que cet écart de masse correspond à celle d'un acide octanoïque, l'équipe japonaise conclut que le peptide doit être octanoylé pour activer le récepteur GHSR. Le peptide synthétique octanoylé est effectivement actif.

Il a longtemps été pensé que l'octanoylation de la ghréline était une réaction auto-catalytique mais le mécanisme est élucidé une dizaine d'années plus tard, par deux équipes de recherche simultanément (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008a). L'octanoylation de la ghréline sur la sérine 3 est catalysée par une unique enzyme : la Ghréline *O*-acyltransférase (GOAT ou MBOAT4), membre de la famille protéique des MBOATs (Membrane-Bound-O-Acyltransférase).

3.2.2. Du gène *Ghrl* à la synthèse de la ghréline et des peptides dérivés

3.2.2.1. Le gène *Ghrl* code pour une préprohormone, la préproghréline

Le gène *Ghrl* ou *GHRL* (Gene ID : 51738), localisé sur le chromosome 3 (3p25-26) chez l'Homme, code pour une préprohormone de 117 acides aminés, la préproghréline (PPG). La séquence du gène *Ghrl* comprend 4 exons codants, 2 exons non codants (exons -1 et 0) et 4 introns ; sa transcription forme un ARNm de 511 paires de base (pb) (Seim et al., 2007) (**Figure 10**). Des sites de fixation des facteurs de transcription USF1 et USF2 (Upstream Stimulatory Factor), AP-1 (Activator Protein-1), C/EBPs (CCAAT/Enhancer Binding Proteins) et de la protéine CREB (cAMP Response Element Binding) ont été identifiés en amont de l'extrémité 5' du gène codant pour la ghréline (Kanamoto et al., 2004; Wei et al., 2005). La transcription de la ghréline pourrait donc être contrôlée par ces facteurs de transcription, mais aucune étude n'a jusqu'à maintenant montré leur influence directe (Seim et al., 2007).

Le gène *Ghrl* a été identifié dans de nombreuses espèces et sa séquence est hautement conservée chez les mammifères (Homme, singe rhésus, rat, souris, vache, porc, mouton, chien

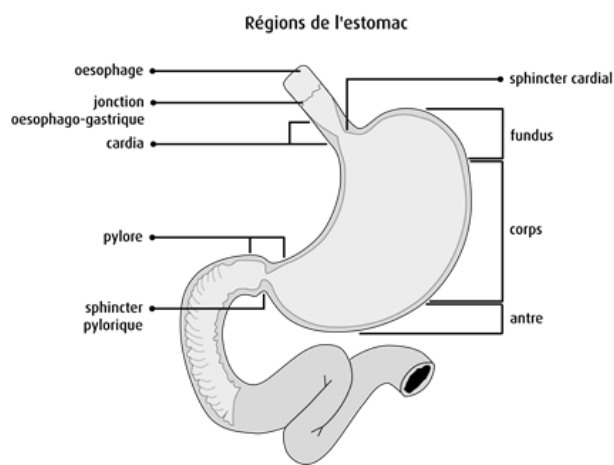
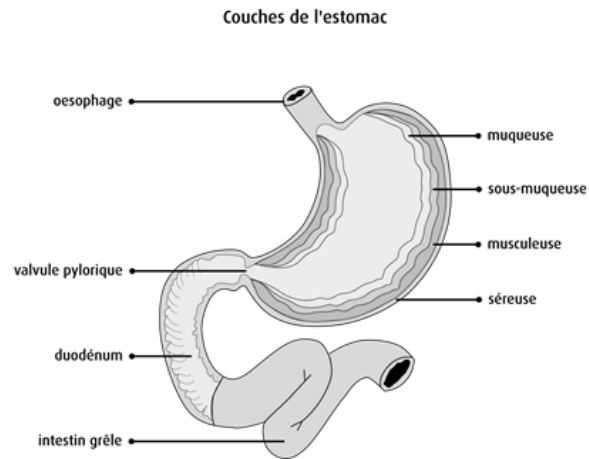


Figure 11. Structure de l'estomac humain (couches de cellules et régions)

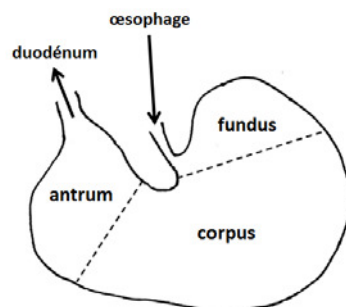


Figure 12. Structure de l'estomac de rat (régions).

La région fundique n'est pas glandulaire chez le rat, contrairement à l'Homme et la délimitation avec le corpus est très reconnaissable

et gerbille) (Angeloni et al., 2004; Tomasetto et al., 2001), notamment la partie codant les 10 acides aminés N-terminaux (Kojima et al., 2004), essentiels pour la reconnaissance du peptide par le récepteur des sécrétagogues de la GH.

3.2.2.2. Les différents peptides encodés par le gène *Ghrl*

Les exons 1 et 2 du gène *Ghrl* codent pour les 28 acides aminés de la ghréline chez l'Homme, la souris et le rat (Zhang et al., 2005) (**Figure 10**). La des-Gln₁₄-ghréline, une autre forme de la ghréline issue d'un épissage alternatif du gène *Ghrl*, a été identifiée chez le rat et la souris (Hosoda et al., 2000a). Ce peptide possède un acide aminé de moins que la ghréline (la glutamine 14), est octanoylé, active le récepteur GHSR et entraîne la sécrétion de GH. Cette forme est minoritaire par rapport à la ghréline chez le rat et la souris, mais les bovins et les ovins expriment uniquement la forme des-Gln₁₄-ghréline (Sato et al., 2012). L'exon 3 du gène *Ghrl* code aussi pour les 23 acides aminés de l'obestatine, une autre hormone peptidique aux fonctions physiologiques encore peu connues (Zhang et al., 2005).

3.2.2.3. Expression de la ghréline et des peptides dérivés dans les tissus

3.2.2.3.1. Expression dans les cellules « ghréline » de l'estomac et l'intestin

La ghréline et les peptides dérivés sont produits dans les cellules endocrines de la muqueuse gastro-intestinale. Plus précisément, c'est dans l'estomac que les cellules synthétisant la ghréline sont les plus nombreuses (Ariyasu et al., 2001). En effet, l'ablation chirurgicale de la muqueuse gastrique chez le rat entraîne une diminution de 80% de la concentration plasmatique en ghréline (Dornonville de la Cour et al., 2001) et une diminution de 65 % chez des Hommes ayant subi une gastrectomie.

L'estomac est constitué de différentes couches cellulaires : la séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse (**Figures 11 et 12**). On distingue deux régions dans la muqueuse gastrique de l'Homme: la muqueuse oxyntique qui tapisse le fundus et le corpus et la muqueuse antrale qui tapisse l'antra. La muqueuse est ponctuée de très nombreuses cryptes qui se prolongent en glandes gastriques, constituées des cellules pariétales responsables de la libération d'HCl, des cellules principales qui sécrètent les enzymes digestives, des cellules ECL (entero chromaffin like) (Andersson et al., 1998) et des cellules endocrines (**Figure 13**). Il existe divers types de cellules endocrines dans les glandes gastriques des mammifères : les

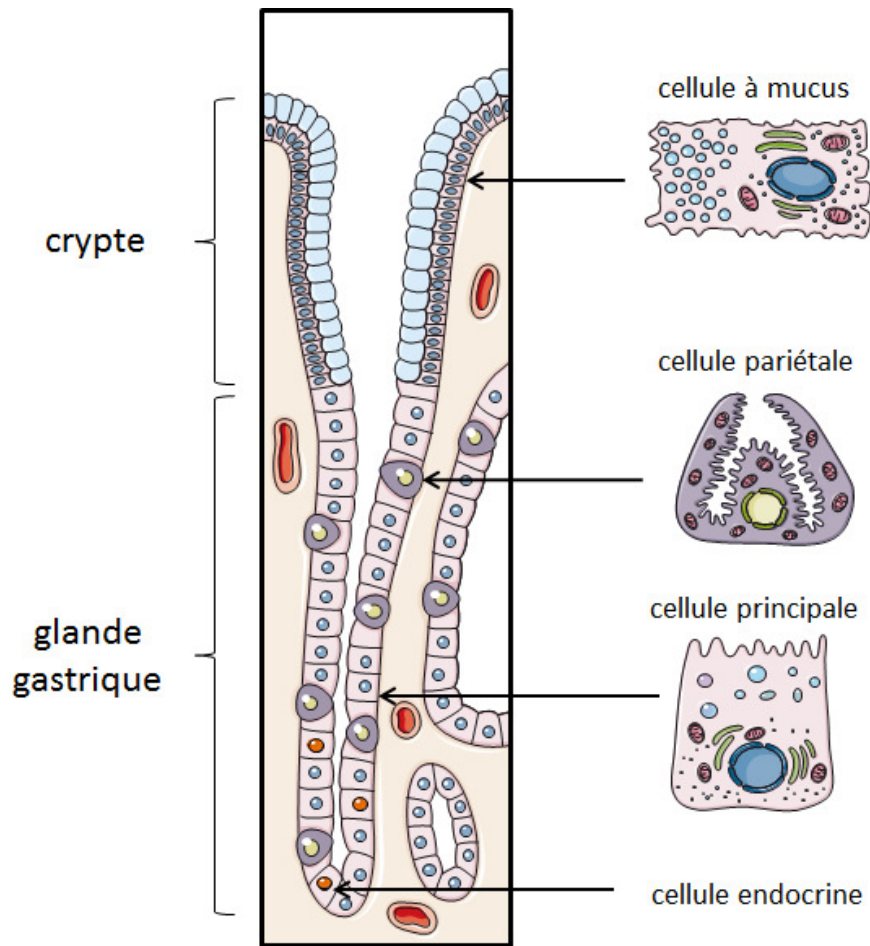


Figure 13. Crypte, glande gastrique et principaux types cellulaires

cellules D, synthétisant la somatostatine ; les cellules G, synthétisant la gastrine, présentes uniquement dans la muqueuse antrale ; les cellules EC, synthétisant la sérotonine ; les cellules X/A ou cellules ghréline, qui représentent environ 20 % des cellules endocrines de la muqueuse oxyntique (Date et al., 2000). Avant la découverte de la ghréline, les cellules X/A (P/D(1) chez l'Homme, A chez les rongeurs et X chez le chien) n'avaient pas de fonction connue et étaient seulement différenciées des autres cellules endocrines par leur forme, ronde et compacte, et par la présence de vésicules de sécrétion denses aux électrons (Sakata et al., 2002).

Les cellules synthétisant de la ghréline sont également présentes au niveau des cryptes et des villosités du duodénum, de l'iléon, du cæcum et du colon. Le nombre de cellules ghréline décroît du duodénum au colon (Sakata et al., 2002). Deux types de cellules produisent la ghréline dans l'intestin : des cellules à pôle muqueux fermé ('closed-type') triangulaires et allongées, régulées généralement par des hormones, des stimulations nerveuses et par la distension mécanique ; des cellules à pôle muqueux ouvert ('opened-type') en contact avec la lumière intestinale, régulées généralement par la présence de nutriments et par le pH.

Cette distribution des cellules ghréline dans le tube digestif est conservée parmi les espèces, des mammifères aux vertébrés inférieurs, ce qui suggère que ces cellules gastriques et intestinales ont joué un rôle important dans l'évolution (Kaiya et al., 2002; Sakata et al., 2010).

3.2.2.3.2. Expression dans d'autres tissus

Le gène *Ghrl* s'exprime également plus faiblement dans d'autres tissus, au niveau de l'hypothalamus, l'hypophyse, le pancréas (cellules ϵ), les reins, les glandes surrénales, le foie, les poumons, la glande thyroïde, les gonades (ovaires et testicules), le placenta et dans certaines cellules cancéreuses (Gnanapavan et al., 2002; Grönberg et al., 2008; Higgins et al., 2007; Kojima et al., 1999). La synthèse de ghréline a également été observée dans les cellules de la glande mammaire de chèvre, capables de synthétiser l'acide octanoïque (Zhang et al., 2013).

Le niveau d'expression de la ghréline dans les différents tissus varie avec l'âge. Il semblerait que chez le fœtus jusqu'à la naissance, chez l'Homme et le rongeur, la principale

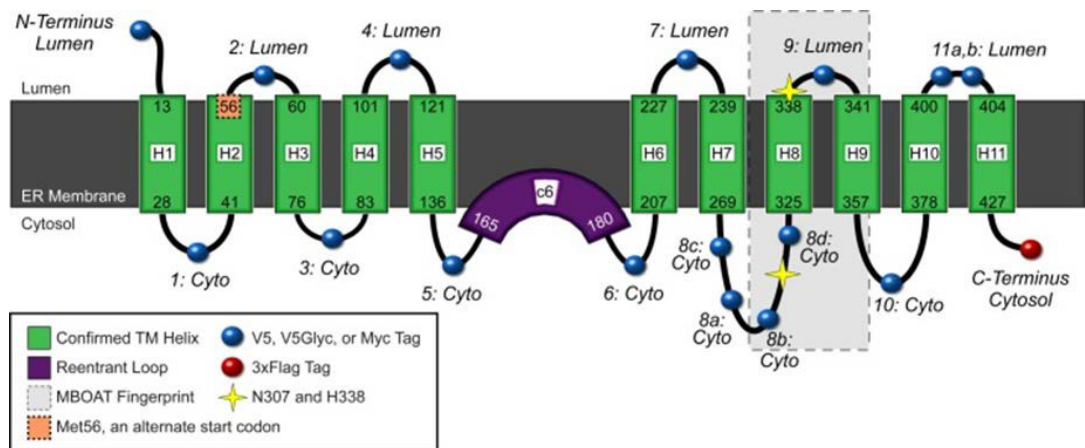


Figure 14. Structure de la Ghréline O-acyltransférase (GOAT ou MBOAT4) (d'après Martin *et al.* 2013)

source de ghréline octanoylée ne soit pas les cellules de l'estomac mais les cellules ϵ du pancréas (Wierup et al., 2014). Progressivement, la production de ghréline dans le pancréas décroît tandis qu'elle augmente dans les cellules de l'estomac.

3.2.3. Octanoylation de la ghréline par la GOAT et sécrétion dans le plasma

La ghréline est la seule hormone connue pour être octanoylée, sur le groupe hydroxyle de la 3^{ème} sérine, et cette modification est nécessaire pour que le peptide soit reconnu par son récepteur (GHSR-1a) (Kojima et al., 2005). L'octanoylation de la ghréline se déroule après la traduction de la préproghréline et est catalysée par la ghréline O-acyltransférase (GOAT).

3.2.3.1. La GOAT catalyse l'acylation de la ghréline

Il a fallu attendre 10 ans entre la découverte de la ghréline octanoylée et la découverte du mécanisme de l'acylation. Il a longtemps été supposé que l'octanoylation était une réaction auto-catalytique mais en 2008, deux équipes découvrent simultanément l'existence de l'enzyme impliquée dans l'acylation de la ghréline (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008a). La GOAT, aussi appelée MBOAT-4, appartient à la famille des MBOAT (Membrane bound O-acyltransferase), qui inclut 16 protéines dont HHAT (hedgehog acyltransferase) et Porc (porcupine), acylant respectivement les protéines SHH (sonic hedgehog) et Wnt. Cette famille de protéines est impliquée dans des réactions d'acylation et d'acétylation (Gutierrez et al., 2008). D'un côté, Yang et al. observent que des cellules INS-1 co-transfectées avec l'ADNc de la préproghréline et de la MBOAT-4 synthétisent la ghréline octanoylée, alors que la co-transfection de la PPG avec chacune des autres MBOATs n'aboutit pas à ce résultat (Yang et al., 2008a). De l'autre côté, Gutierrez et al. constatent que le traitement de cellules MTC (Medullary thyroid carcinoma) avec des petits ARN interférents (siRNA, pour small interfering RNA) des MBOATs n'entraîne une diminution de la ghréline octanoylée que pour la MBOAT-4 (Gutierrez et al., 2008). De plus, des souris Knock out (KO) pour le gène MBOAT-4^{-/-} ne produisent pas de ghréline octanoylée, confirmant le rôle de l'enzyme dans l'acylation de la ghréline.

La GOAT est une enzyme polytopique de la membrane du RE, d'environ 45 kDa, possédant 11 domaines transmembranaires (TM) et une hélice rentrante (Taylor et al., 2013) (**Figure 14**). Elle est synthétisée dans un grand nombre d'organes correspondant à ceux qui

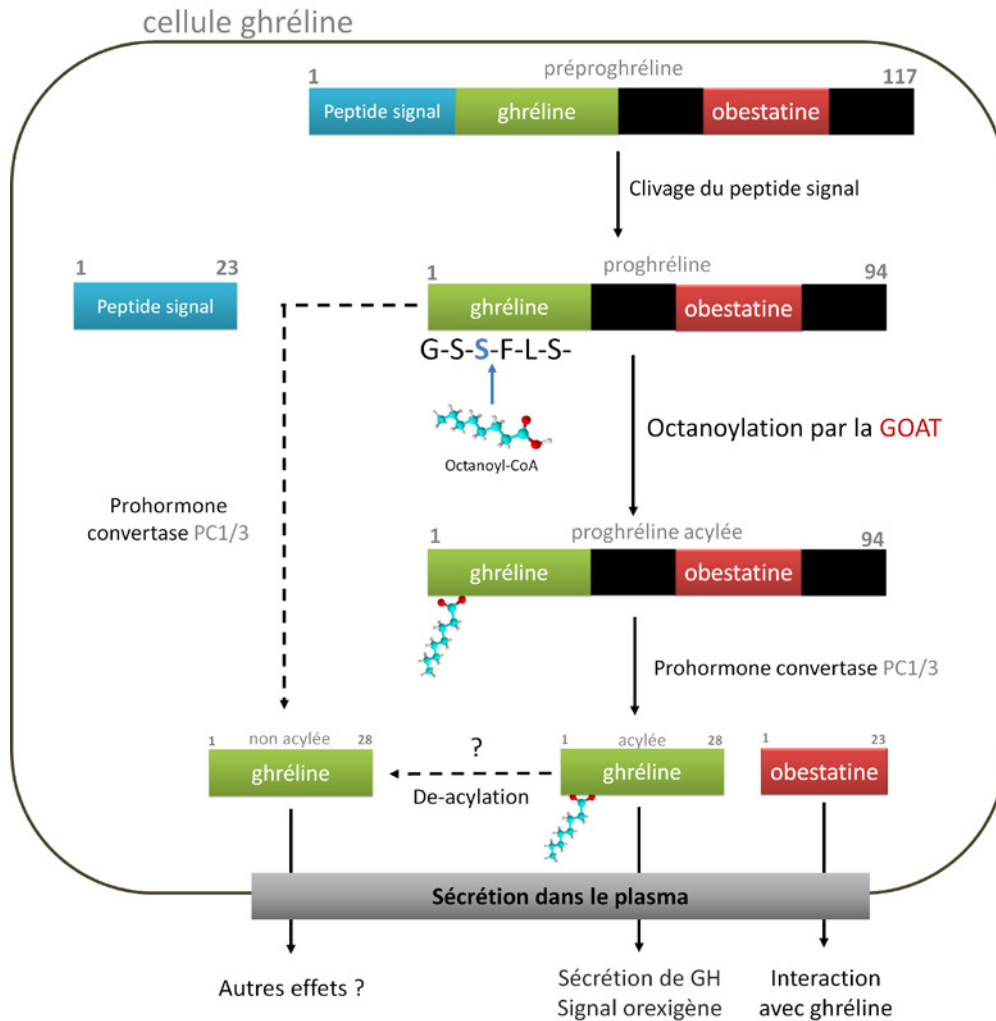


Figure 15. Maturation de la ghréline et octanoylation post-traductionnelle

La préproghréline est transcrite à partir du gène *Ghrl* et traduite, et le peptide signal est clivé dans le réticulum endoplasmique (RE). La proghréline est octanoylée sur la serine 3 N-terminale, sous l'action de la ghréline O-acyltransférase (GOAT). La proghréline est clivée par la prohormone convertase 1/3 (PC1/3) en ghréline octanoylée et en C-ghréline. La C-ghréline est clivée une dernière fois, en obestatine. La ghréline non octanoylée provient soit de la ghréline octanoylée qui est désacylée, ou de la proghréline qui est clivée sans être octanoylée. La ghréline octanoylée et non octanoylée ainsi que l'obestatine sont sécrétées dans le plasma mais seule la forme octanoylée peut se lier au récepteur GHSR-1a.

expriment la ghréline (estomac, intestin, hypothalamus, hypophyse, pancréas...) (Lim et al., 2011) particulièrement dans les cellules ghréline de la muqueuse oxyntique et intestinale ($71,2 \pm 1,4$ % des cellules ghréline co-expriment la GOAT) (Sakata et al., 2009), mais également dans les cellules ECL chez le rat (Stengel et al., 2010).

Actuellement, la ghréline est l'unique substrat connu de la GOAT. Pour l'octanoylation, il a été démontré par des études utilisant la mutagénèse que la séquence Gly₁-X₂-Ser₃-Phe₄, présente dans la séquence de la ghréline, était essentielle pour l'interaction avec la GOAT. Les caractéristiques enzymatiques de la GOAT native ne sont pas bien connues et la mesure de son activité reste un défi (Taylor et al., 2012).

3.2.3.2 Maturation de la ghréline dans les cellules de l'estomac

Les étapes de la maturation de la ghréline se déroulent principalement dans les cellules ghréline de la muqueuse oxyntique. Après avoir été traduite, la préproghréline (117 a.a.) est clivée une première fois dans le RE, formant ainsi la proghréline (94 a.a.) et un peptide signal (23 a.a.) (**Figure 15**). L'octanoyl-CoA, la forme activée de l'acide octanoïque, est transporté depuis le cytosol vers l'intérieur du RE, sous l'action de la GOAT, et utilisé par cette même enzyme pour octanoyler la proghréline sur la 3^{ème} sérine N-terminale. Les produits de la réaction d'octanoylation, la proghréline octanoylée et le CoA-SH sont relâchés par l'enzyme. Puis, la proghréline octanoylée est transportée depuis le RE vers l'appareil de Golgi où elle va être clivée par une prohormone convertase (PC1/3, PC 2 ou furine) en ghréline acylée (28 a.a.) et en C-ghréline (66 a.a.) (Takahashi et al., 2009). La prohormone convertase 1/3 (PC1/3) (Zhu et al., 2006) est co-localisée avec la ghréline dans les cellules de la muqueuse oxyntique et agit sur la séquence d'acides aminés LQPR ↑ ALAG (Ozawa et al., 2007). La PC1/3 est également responsable de la maturation du peptide GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) et de la CCK (Cholécystokinine). La C-ghréline est ensuite clivée en obestatine (23 a.a.) (Zhang et al., 2005).

Dans les cellules, environ 30% de la ghréline totale est sous forme octanoylée et le reste sous forme non octanoylée. Il est possible que la ghréline non octanoylée soit synthétisée en suivant les mêmes étapes de maturation que la ghréline octanoylée (étape d'octanoylation incluse) et qu'elle soit désacylée par la suite, ou qu'elle ne soit pas octanoylée par la GOAT

pendant la maturation. Des études ont montré que l'acide octanoïque est le substrat privilégié de la GOAT mais l'enzyme peut également utiliser d'autres acides gras à chaîne moyenne pour l'acylation de la ghréline (C6:0, C10:0 et C10:1) (Darling et al., 2015).

La ghréline peut être phosphorylée par des protéines kinases C α , β et δ sur la Serine 18. Cette phosphorylation de la ghréline modifie la structure secondaire du peptide et par conséquent, ses propriétés d'ancrage à la membrane (Dehlin et al., 2008). Le rôle de cette phosphorylation dans la cellule n'a pas encore été déterminé, mais il est probable que cela influe sur la localisation subcellulaire du peptide.

3.2.3.3. Sécrétion de la ghréline octanoylée et non acylée dans le plasma

Les peptides matures octanoylés et non octanoylés, sont empaquetés dans des vésicules et sécrétés dans la circulation sanguine. Cette sécrétion est modulée par plusieurs récepteurs tels que FFAR 2 et 3 (free fatty acid receptor), GPR 120 et 40 (G protein-coupled receptor) qui sont activés par les AGCL et les AGCM présents dans le contenu gastrique (Janssen et al., 2013, 2012). La ghréline, octanoylée ou non, peut circuler librement dans le plasma ou interagir avec les lipoprotéines plasmatiques. Ainsi, il a été montré qu'environ 70% de la ghréline octanoylée est liée à des lipoprotéines (VLDL, LDL et HDL) et les 30% restants sont libres. Environ 50% de la ghréline non octanoylée est liée spécifiquement aux HDL ou libre (48%) (Holmes et al., 2009).

Si la ghréline octanoylée a généralement été décrite comme représentant 10% de la ghréline totale circulante chez l'Homme (Patterson et al., 2005), il semble que la concentration de ghréline non octanoylée ait été surestimée, ceci étant dû à la dégradation rapide de la forme octanoylée, après prélèvement (Delhanty et al., 2015). Il est plus probable que la ghréline octanoylée représente en fait 30 à 50% de la ghréline totale chez l'Homme et les rongeurs (Nishi et al., 2005a). Les conditions de prélèvement du plasma, comme par exemple les anesthésiques, influencent également la concentration de ghréline.

La ghréline octanoylée peut être désacylée dans le plasma, ce qui s'explique par une hydrolyse spontanée de la liaison oxyester dans le plasma et par l'action de certaines enzymes telles que la butyrylcholine estérase (EC 3.1.1.8) chez l'Homme, et la carboxylestérase (EC

3.1.1.1) chez le rat (De Vriese et al., 2007). Chez l'Homme, il a été observé que la désacylation de la ghréline se déroulait surtout au contact des lipoprotéines LDL, sous l'action de la butyrylcholine estérase, et dans la fraction du plasma pauvre en lipoprotéines par la PAF-AH (platelet-activating factor acetylhydrolase, EC 3.1.1.47). Néanmoins, des immunoglobulines spécifiques de la ghréline (IgG) peuvent se lier à la ghréline octanoylée et la protéger de la dégradation (Takagi et al., 2013).

3.2.3.4. Cycle de sécrétion de la ghréline dans le plasma

La sécrétion de ghréline dans le plasma présente des variations pulsatiles (moins marquées que celle de la GH) et son cycle est ultradien. La concentration de ghréline circulante augmente avant les repas et diminue après ceux-ci (de 26% après 20 min de digestion) (Tolle et al., 2002). La chute postprandiale de la concentration en ghréline dans le plasma pourrait être due, au moins partiellement, à l'élévation de la concentration plasmatique d'insuline (Solomon et al., 2008). La concentration en ghréline s'élève en cas de jeûne, est réduite chez les obèses (Álvarez-Castro et al., 2013) et élevée chez les anorexiques (Soriano-Guillén et al., 2004). Les facteurs influençant la sécrétion de la ghréline sont cependant encore mal connus.

3.2.4. Activation de GHSR-1a par la ghréline octanoylée

La ghréline octanoylée circulante va pouvoir se lier au récepteur sécrétagogue de la GH.

3.2.4.1. Structure et expression du récepteur GHSR-1a

Le gène *GHS-R*, situé sur le chromosome 3 (3q26-27) chez l'Homme, code pour un récepteur couplé aux protéines G à 7 domaines transmembranaires (DTM) (366 a.a.), le GHSR-1a. Un variant d'épissage a été décrit, le GHSR-1b (5 DTM, 289 a.a.), mais celui-ci n'est pas fonctionnel (Smith et al., 1997). GHSR-1a est principalement exprimé dans le noyau arqué de l'hypothalamus, mais aussi dans l'hypophyse, le noyau ventromédian, l'hippocampe et la moelle épinière. Dans une moindre mesure, ce récepteur est aussi synthétisé dans le cœur, les poumons, le pancréas, l'intestin, le tissu adipeux, les glandes surrénales, la thyroïde et les testicules (Guan et al., 1997; Howard et al., 1996). Son expression a aussi été observée dans les cellules de la glande mammaire de chèvre en lactation, où la ghréline est également

synthétisée (Zhang et al., 2013), suggérant un mode d'action autocrine/paracrine de la ghréline.

3.2.4.2. Fixation de la ghréline acylée sur le récepteur GHSR-1a

Pour atteindre le principal site d'expression de son récepteur, la ghréline acylée doit donc traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) grâce à un système de transport spécifique (Banks et al., 2002). Le transport de la ghréline à travers la BHE dépend de sa conformation primaire dépendant elle-même de la séquence d'acides aminés et des modifications post-traductionnelles, notamment l'octanoylation. Ainsi, chez la souris, la ghréline non-acylée peut traverser la BHE dans le sens « sang-cerveau » alors que la ghréline acylée peut être transportée dans les deux directions mais préférentiellement dans le sens « cerveau-sang ». La ghréline acylée humaine, injectée chez la souris, peut traverser la BHE de manière équivalente, dans les deux sens.

La fixation de la ghréline acylée (ghréline et des-gln₁₄-ghrelin octanoylée ou décanoylée) sur le récepteur GHSR-1a entraîne la sécrétion de GH (191 a.a.) *via* une augmentation du calcium intracellulaire par activation de la voie IP₃/DAG (Ghigo et al., 2005). En absence d'agoniste, le récepteur GHSR-1a présente une forte activité constitutive. La ghréline non acylée ne peut pas activer ce récepteur et a longtemps été considérée comme inactive, mais des études ultérieures ont montré que la forme non acylée exerce des effets physiologiques, par un mécanisme encore inconnu (Delhanty et al., 2013). D'autres ligands endogènes (motiline, adénosine) peuvent se fixer au récepteur de la ghréline, mais l'effet sur le calcium est plus faible et la sécrétion de GH, presque nulle.

3.3. Effets physiologiques de la ghréline octanoylée

En plus d'entraîner la sécrétion d'hormone de croissance, la ghréline octanoylée est une hormone pléiotrope qui agit sur: l'appétit, l'adiposité, l'homéostasie du glucose, le système immunitaire, la motilité et les sécrétions gastriques, la sécrétion de prolactine et d'hormone corticotrope, les fonctions sexuelles, l'anxiété, le sommeil, les fonctions cardiaques (van der Lely et al., 2004). Parmi ces multiples fonctions, seuls les effets de la ghréline octanoylée pouvant aussi être régulés par la consommation d'AGCM seront présentés dans cette partie.

3.3.1. Effets *via* la sécrétion de GH

La ghréline octanoylée exerce un effet puissant sur la sécrétion de GH, en synergie avec la GHRH (Hataya et al., 2001; Peino et al., 2000) et agit donc sur les fonctions physiologiques régulées par l'hormone de croissance telles que la croissance longitudinale des os, la prolifération cellulaire et le métabolisme protéique, lipidique et glucidique (Chia, 2014). La fixation de la GH sur son récepteur (GHR, growth hormone receptor), exprimé par les cellules du foie, des tissus adipeux et des muscles, entraîne la sécrétion d'IGF-1 (Insulin-like factor-I, ou somatomédine C) qui va agir en association avec la GH. Ces deux hormones stimulent la production hépatique de glucose et sa sécrétion dans le plasma, augmentant ainsi la glycémie. De plus, ces hormones favorisent la lipogenèse *de novo* et la sécrétion des triglycérides hépatiques, en activant la transcription des gènes *Ppar-α*, *Cd36* et la phosphorylation de SREBP-1a. La GH permet également la régénération hépatique. Au niveau des tissus adipeux, la GH et IGF-1 stimulent la lipolyse en activant l'hormone HSL (Lipase hormono-sensible) et la prolifération, la différenciation et la sénescence des préadipocytes (Berryman et al., 2013). Au niveau des muscles squelettiques, ces deux hormones permettent la croissance, la maintenance, la réparation et la régénération. Néanmoins, les souris n'exprimant pas le récepteur de la ghréline (*Ghsr*^{-/-}) ont une taille normale et présentent une composition corporelle comparable à des souris de phénotype sauvage (Sun et al., 2004).

3.3.2. Effet sur l'homéostasie énergétique

3.3.2.1. Effet orexigène

La ghréline octanoylée se distingue des autres peptides gastro-intestinaux circulants par son effet orexigène (augmentation de l'appétit). La ghréline octanoylée est le peptide orexigène circulant le plus puissant (Kojima et al., 2005) et initie les repas. En effet, la concentration plasmatique de ghréline augmente avant un repas et diminue rapidement après celui-ci (Cummings et al., 2001). L'injection de ghréline octanoylée au niveau périphérique et central chez le rongeur (Tschöp et al., 2000; Wren et al., 2000) et chez l'Homme (Wren et al., 2001) augmente la consommation alimentaire. Chez les patients atteints du syndrome de Prader-Willi, caractérisé par une hypotonie dès la naissance et une hyperphagie conduisant à une obésité morbide, la concentration en ghréline octanoylée mesurée est de fait

anormalement élevée (Purtell et al., 2011). Une étude récente chez de jeunes adultes atteints du syndrome de Prader-Willi conclut néanmoins que l'hyperphagie n'est pas due à un dysfonctionnement de la réponse du système ghréline-GOAT après un repas (Kuppens et al., 2016).

L'appétit est régulé dans l'hypothalamus par les neurones NPY (neuropeptide Y)/AgRP (agouti-related protein) à l'effet orexigène, localisés dans le noyau arqué (ARC), et les neurones POMC (pro-opiomélanocortine) à l'effet anorexigène, situés dans le noyau paraventriculaire (PVN) (Xue et al., 2006). La ghréline octanoylée se fixe sur le récepteur GHSR-1a, active les neurones NPY/AgRP et inhibe les neurones POMC, indépendamment de la sécrétion de la GH (Chen et al., 2004; Kohno et al., 2003). La transduction du signal se fait par la protéine AMPK (AMP-activated protein kinase) impliquée dans l'homéostasie énergétique. L'AMPK inhibe l'ACC et active l'enzyme CPT1 (Carnitine palmitoyltransférase I), ce qui favorise l'entrée des AGCL dans les mitochondries. La β -oxydation est activée et la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) croît ce qui entraîne la transcription de l'enzyme mitochondriale UCP2 (uncoupling protein 2) (Andrews et al., 2008). L'activité d'UCP2 est stimulée et neutralise les DRO ce qui permet la poursuite de la β -oxydation des AGCL et maintient l'état d'activation des neurones NPY/AgRP ainsi que l'état d'inactivation des neurones POMC ce qui déclenche la consommation de nourriture. Il semblerait que la voie mTORC1/S6K1 soit aussi impliquée dans l'effet orexigène de la ghréline (Stevanovic et al., 2013).

Cependant, des études sur des souris KO pour la ghréline, la GOAT ou le GHSR-1a (Smet et al., 2006; Sun et al., 2003; Wortley et al., 2004), ou des souris surexprimant la ghréline (Reed et al., 2008) ont montré des résultats variables sur la consommation alimentaire, si bien que l'essentialité de la ghréline endogène sur le déclenchement de l'appétit est controversée (Albarran-Zeckler et al., 2011). En revanche, il semble y avoir un effet de la ghréline sur la prise alimentaire hédonique qui correspond à la consommation de nourriture motivée par le plaisir et sans réel besoin énergétique (Egecioglu et al., 2010; Shimbara et al., 2004; Walker et al., 2012). Dans le cas de la ghréline, la consommation hédonique concerne surtout les aliments riches en lipides et en sel (Cai et al., 2013). Il semblerait que cette action de la ghréline sur la consommation hédonique passe par une élévation du niveau d'expression des

récepteurs CD36 (cluster de différenciation 36), GPR120 (Récepteur couplé aux protéines G 120) et ENaC (Canal sodium épithélial) (Cai et al., 2013).

L'obestatine, également synthétisée à partir du gène *Ghrl* (Zhang et al., 2005), a d'abord été décrite comme exerçant un effet anorexigène après fixation sur le récepteur orphelin GPR39 (Moechars et al., 2006; Zhang et al., 2005). Cependant, ces résultats n'ont pas été observés dans les études ultérieures et sont aujourd'hui controversés (Chartrel et al., 2007; Holst et al., 2007; Van Dijck et al., 2009). Il semble néanmoins que l'obestatine puisse interagir avec la ghréline et contrer l'effet de cette dernière sur la prise alimentaire et la sécrétion de GH, lorsque les deux peptides sont co-administrés à dose équimolaire, chez les rongeurs (Hassouna et al., 2010, 2012; Zizzari et al., 2007).

3.3.2.2. Effet sur la masse corporelle et l'adiposité

La ghréline acylée augmente le stockage des graisses et la masse corporelle (Tschöp et al., 2000; Wren et al., 2001), active la lipogénèse de novo et inhibe le catabolisme des lipides (Sangiao-Alvarellos et al., 2009), diminue la thermogénèse et la dépense énergétique (Asakawa et al., 2001; Yasuda et al., 2003). L'injection de ghréline augmente la concentration en triglycérides dans le foie de souris de phénotype sauvage, mais pas lorsque le gène *Ghsr-1a* est éteint (Barazzoni et al., 2005; Davies et al., 2009; Sangiao-Alvarellos et al., 2009).

Si l'effet de la ghréline sur la mise en réserve des lipides est en accord avec l'effet orexigène (§ 3.3.2), cela va à l'encontre de l'effet sécrétagogue de la GH, cette dernière favorisant la mobilisation des réserves de lipides dans les adipocytes (§ 3.3.1). Il semblerait que l'action de la ghréline sur le métabolisme lipidique dans les tissus périphériques soit, au moins partiellement (Theander-Carrillo et al., 2006), indépendante du SNC et du récepteur GHSR-1a (Perez-Tilve et al., 2011; Tsubone et al., 2005) et que la ghréline non acylée joue un rôle dans l'adiposité (Rodríguez et al., 2009; Thompson et al., 2004). L'effet de la ghréline octanoylée et non octanoylée sur l'adiposité n'a pas été totalement clarifié.

3.3.3. Effet sur l'homéostasie du glucose et sur la résistance à l'insuline

La ghréline, la GOAT et le récepteur GHSR-1a, sont exprimés du stade fœtal à l'âge adulte dans les cellules α et β du pancréas, qui régulent l'homéostasie du glucose en sécrétant

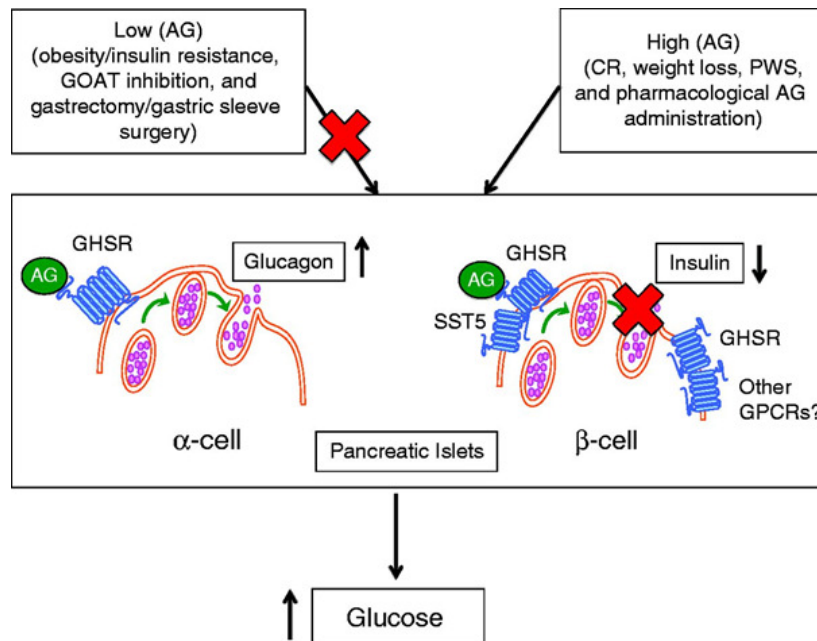


Figure 16. Régulation des îlots de Langerhans par la ghréline acylée (d'après Heppner *et al.*, 2014)

Une forte concentration de ghréline acylée active le récepteur GHSR-1a dans les cellules α , entraînant une sécrétion de glucagon et active ce même récepteur dans les cellules β , inhibant ainsi la sécrétion d'insuline. Ces deux actions combinées conduisent à une augmentation de la glycémie. Les fortes concentrations de ghréline octanoylée sont observées en cas de restriction calorique (CR), de perte de poids, après une injection d'analogues de la ghréline, dans le cas d'un syndrome de Prader-Willi. Lorsque la concentration en ghréline acylée est faible, il n'y a pas d'effet sur la sécrétion de glucagon et d'insuline. Les faibles concentrations de ghréline acylée sont mesurées chez les obèses et les sujets insulino-résistants et après une injection d'inhibiteur de la GOAT ou après une gastrectomie. (*SST5, somatostatin receptor subtype 5*)

le glucagon et l'insuline (Volante et al., 2002; Wierup et al., 2004). Il semblerait donc que l'action de la ghréline se fasse par communication autocrine/paracrine. Un nouveau type de cellules exprimant la ghréline dans le pancréas, les cellules ϵ , a également été identifié, chez le rongeur (Arnes et al., 2012).

A forte concentration, la ghréline octanoylée entraîne la sécrétion du glucagon par les cellules α (Chuang et al., 2011) et inhibe la sécrétion d'insuline par les cellules β (Dezaki, 2013; Reimer et al., 2003) ce qui entraîne une augmentation de la glycémie chez l'Homme et le rongeur (Heppner et al., 2014). Les situations physiologiques où de fortes concentrations de ghréline octanoylée peuvent être mesurées sont le jeûne, la restriction calorique, l'anorexie, la boulimie, la perte de poids ou le syndrome de Prader-Willi. Ainsi, la ghréline acylée limite l'hypoglycémie en cas de restriction calorique sévère mais n'est pas essentielle à la survie dans ces conditions (Yi et al., 2012), comme cela avait pourtant été suggéré initialement (Zhao et al., 2010). L'effet de la ghréline dans les cellules β passe par le récepteur GHSR-1a qui se dimérise avec le récepteur SSTR5 de la somatostatine et mobilise la protéine $G\alpha_{i/0}$ (Park et al., 2012) ce qui inhibe la sécrétion d'insuline. Lorsque la concentration en ghréline acylée est basse, chez les sujets obèses ou insulino-résistants, il n'y a pas d'effet observé sur la sécrétion d'insuline et de glucagon (**Figure 16**).

L'effet de la ghréline non octanoylée sur la sécrétion d'insuline et de glucagon est mal compris. Certaines études montrent un effet activateur sur la sécrétion d'insuline, d'autres n'observent pas d'effet (Broglia et al., 2003). Une forte concentration en ghréline non octanoylée bloque l'action de la ghréline sur l'insuline, ce qui peut s'expliquer par un effet de compétition entre les deux formes (octanoylée et non acylée) sur le récepteur GHSR-1a (Qader et al., 2008).

3.3.4. Effet sur l'inflammation

La ghréline octanoylée, produite par les monocytes et les cellules T, exerce un effet anti-inflammatoire *in vivo* et *in vitro* (Baatar et al., 2011). L'injection de ghréline octanoylée diminue l'expression et la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, TNF- α), quels que soit la dose, la pathologie et les horaires de traitements (Taub, 2007). La ghréline octanoylée est apparue comme une candidate intéressante dans le traitement de certains

troubles du système immunitaire (arthrite, maladie inflammatoire chronique de l'intestin, sclérose en plaques) (Chorny et al., 2008; Gonzalez-Rey et al., 2006; Souza-Moreira et al., 2013).

3.3.5. Effets sur la tension artérielle et le fonctionnement cardiaque

La ghréline, synthétisée dans les cardiomyocytes et les cellules endothéliales (Kleinz et al., 2006), exerce des effets favorables sur le fonctionnement cardiovasculaire (Isgaard et al., 2008) : l'injection de ghréline entraîne une dilatation des vaisseaux sanguins, une constriction de l'artère coronaire, une amélioration des fonctions endothéliales et une diminution de la pression sanguine (Zhang et al., 2010). Les effets de la ghréline sont en partie dus à l'effet protecteur de la GH. Mais la ghréline peut également agir directement, par mode endocrine, autocrine et paracrine, étant donné que son récepteur GHSR-1a est également exprimé dans le cœur. Il semblerait que la ghréline octanoylée et la ghréline non octanoylée puissent avoir un effet anti-apoptotique sur les cardiomyocytes, *via* un récepteur différent du GHSR-1a (Baldanzi et al., 2002).

Chez des individus sains, l'injection par voie intraveineuse de ghréline (10 µg/kg) diminue significativement la pression artérielle (Nagaya et al., 2001). Il a cependant été montré que la ghréline peut activer la réabsorption du sodium dans les tubes collecteurs des reins en agissant sur les canaux sodium épithéliaux, par un mécanisme dépendant de l'AMPc, entraînant ainsi une augmentation de la tension (Seki, 2013). Une hypertension est souvent observée chez les personnes obèses. La concentration en ghréline dans le plasma est pourtant plus faible chez les obèses mais il a été émis comme hypothèse que la production de ghréline au niveau de leurs reins pourrait être plus élevée et avoir une action directe sur les canaux sodium, entraînant ainsi une hypertension.

3.3.6. Autres effets de la ghréline

Même si le rôle de la ghréline octanoylée n'est pas vital, elle régule de nombreuses fonctions, en plus de celles déjà présentées. Ainsi, l'élévation de la ghréline octanoylée et totale dans le lait maternel et dans le sérum des nourrissons allaités suggère un effet important dans le développement des nouveau-nés (Ilcol et al., 2007), même si celui-ci n'est pas encore

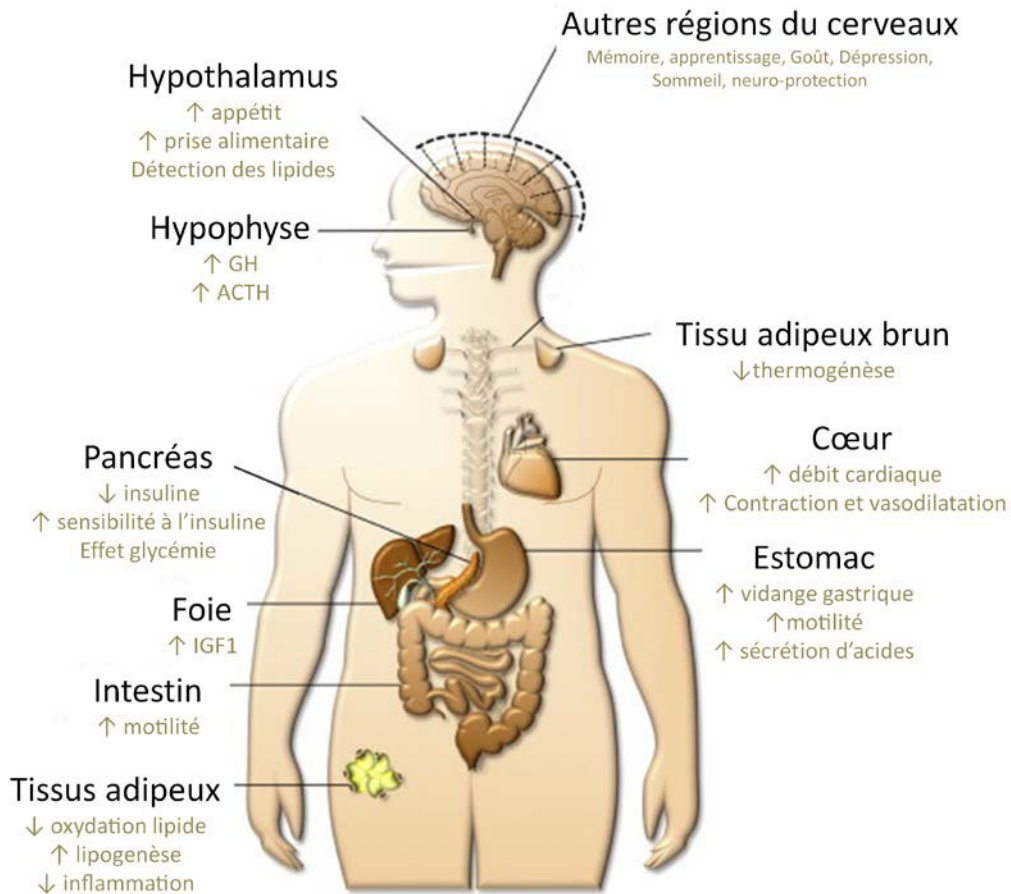


Figure 17. Fonctions régulées par la ghréline (d'après Muller et al. 2015)

identifié. La ghréline diminue l'anxiété chronique et les symptômes dépressifs (Lutter et al., 2008), favorise la mémorisation et l'apprentissage (Asakawa et al., 2001), régule le sommeil (Bodosi et al., 2004). En plus de la sécrétion de GH, la ghréline octanoylée régule également la sécrétion de prolactine et d'ACTH (corticotrophine) (van der Lely et al., 2004) ; l'injection d'inhibiteurs de la GOAT chez le rat entraîne d'ailleurs une diminution significative des concentrations d'ACTH, d'aldostérone et de corticostérone, dans le plasma (Rucinski et al., 2012). La ghréline stimule la guérison des lésions de la muqueuse gastrique et pourrait avoir un effet anti-cancéreux dans l'estomac (Rau et al., 2013; Warzecha et al., 2014). On peut également citer un effet régulateur de la réabsorption des sels biliaries, observé chez des souris GOAT^(-/-) (Kang et al., 2012).

Conclusion de la synthèse bibliographique

Les acides gras saturés à chaîne moyenne (AGCM) possèdent des spécificités métaboliques distinctes de celles des acides gras à chaîne longue (AGCL), ce qui est dû à leurs propriétés physico-chimiques, mais aussi à une affinité moindre avec certaines enzymes (I-FABP, Acyl-CoA Synthase). Les AGCM sont synthétisés dans les cellules de la glande mammaire en lactation et on les trouve donc dans les produits laitiers, mais également certaines huiles (coprah, palmiste). L'émulsification est facilitée pour les AGCM en raison de leur plus grande solubilité et de leur plus faible tension interfaciale avec le milieu aqueux. Les triglycérides à chaînes moyennes (TCM) sont rapidement hydrolysés par les lipases préduodénale et pancréatique car les chaîne moyennes (1) sont plus facilement émulsifiées que les chaînes longues, (2) sont estérifiées en position *sn-3* (produits laitiers) et *sn-1* et 3 (huiles végétales) des triglycérides, qui sont les sites d'hydrolyse préférentiels de la lipase préduodénale, (3) n'inhibent pas l'activité de la lipase préduodénale. Les AGCM peuvent donc être précocement absorbés, dès le duodénum, voire même l'estomac. Contrairement aux AGCL (libres ou sous forme de monoglycérides) qui, une fois absorbés dans les entérocytes, sont réestérifiés, empaquetés dans les chylomicrons et sécrétés dans la circulation générale, les AGCM libres sont transportés par l'albumine dans la veine porte jusqu'aux cellules du foie, pour être β -oxydés et sont donc peu stockés dans les tissus périphériques. La consommation d'AGCM entraîne des effets sur la lipidémie plasmatique, l'homéostasie du

glucose, la satiété et le stockage des lipides dans le tissu adipeux, l'inflammation (**Figure 4**). Une autre particularité des AGCM (essentiellement le C8:0), récemment découverte, est leur capacité à activer la ghréline, après formation d'une liaison oxyester catalysée par la ghréline-O Acyltransférase. La ghréline octanoylée exerce également des effets sur l'homéostasie du glucose, la satiété et le stockage des lipides dans le tissu adipeux, l'inflammation et elle déclenche aussi la sécrétion de GH (**Figure 17**). Or, les effets physiologiques des AGCM s'opposent, pour un certain nombre, aux effets de la ghréline octanoylée, notamment concernant l'effet sur la satiété et la prise de poids.

Objectifs de recherche

Dans la synthèse bibliographique, les caractéristiques métaboliques des acides gras saturés à chaîne moyenne (AGCM) ont été présentées, et plus particulièrement celles de l'acide octanoïque (C8:0) capable d'octanoyler la ghréline, la seule hormone peptidique orexigène. Les AGCM sont *a priori* essentiellement apportés par l'alimentation, puisque leur biosynthèse endogène n'a été observée que dans les cellules de la glande mammaire en lactation. Rapidement absorbés et catabolisés dans le foie, ces acides gras sont peu stockés dans les tissus. En raison de leurs caractéristiques métaboliques, ils ont été incorporés aux régimes de personnes obèses ou en surpoids, afin de favoriser la perte de poids. L'efficacité des AGCM pour cette utilisation reste néanmoins controversée, comme le prouvent les récentes méta-analyses. L'étude des effets physiologiques des AGCM alimentaires s'est complexifiée avec la récente découverte de l'octanoylation de la ghréline, nécessaire à la reconnaissance de ce peptide par le récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance GH (GHSR-1a). La ghréline est essentiellement produite dans les cellules de la muqueuse gastrique, où les AGCM alimentaires sont suspectés pouvoir pénétrer, depuis le contenu gastrique. Environ 10 à 50% de la ghréline totale circulante est octanoylée par une enzyme de l'estomac, la Ghréline-O-Acyltransférase (GOAT). En plus de provoquer la sécrétion de GH, la ghréline octanoylée joue un rôle dans le déclenchement de la prise alimentaire, favorise l'adiposité, la prise de poids, augmente la glycémie et active le métabolisme lipidique. Ainsi, par cette liaison covalente à la ghréline, le C8:0 pourrait moduler l'appétit, la masse corporelle, l'adiposité et l'homéostasie du glucose, d'une manière qui s'oppose aux effets connus des AGCM.

Dans le but de mieux comprendre l'apparente contradiction entre les effets connus des AGCM sur la masse corporelle et la satiété, et l'effet de l'octanoylation de la ghréline, des expérimentations physiologiques ainsi que d'autres approches plus moléculaires sont nécessaires. Peu de données sont disponibles sur l'effet de la consommation régulière d'AGCM sur la régulation de l'octanoylation de la ghréline. L'axe ghréline-GOAT informe le système nerveux central (SNC) de la disponibilité en nutriments. La mise au point d'antagonistes de la ghréline octanoylée et d'inhibiteurs de la GOAT pourraient permettre de bloquer l'effet orexigène, la prise de poids et ainsi constituer des traitements pharmacologiques contre l'obésité. Comprendre l'impact de la disponibilité ou l'absence du

substrat lipidique de la GOAT, l'acide octanoïque, dans le régime alimentaire pourrait être un autre moyen de contrôler les effets de la ghréline octanoylée.

Ainsi, les objectifs des travaux réalisés au cours de mon doctorat étaient d'étudier l'influence de la consommation de l'acide octanoïque alimentaire sur la régulation de l'axe ghréline-GOAT, agissant sur la consommation alimentaire et potentiellement sur la prise de poids pouvant conduire à l'obésité. Pour répondre à cet objectif, quatre approches principales de recherche ont été mises en place :

A. une approche physiologique ayant pour but d'étudier l'impact d'un apport chronique d'acide octanoïque à différentes doses et dans plusieurs conditions physiologiques (régime moyennement riche en lipides, régime hyperlipidique et restriction calorique) sur la consommation alimentaire, les taux plasmatiques de ghréline octanoylée et non octanoylée, les paramètres lipidiques circulants, la composition en acides gras des tissus et l'adiposité chez le rat adulte,

B. une seconde approche physiologique s'attachant à démontrer et quantifier l'absorption gastrique de l'acide octanoïque (ingéré sous forme de trioctanoïne) chez le raton et l'effet de l'inhibition partielle de la lipase préduodénale sur l'acylation de la ghréline,

C. une approche *in vitro* ayant pour but de comparer l'utilisation cellulaire de l'acide octanoïque dans les cellules de la muqueuse gastrique et dans les hépatocytes, en culture primaire,

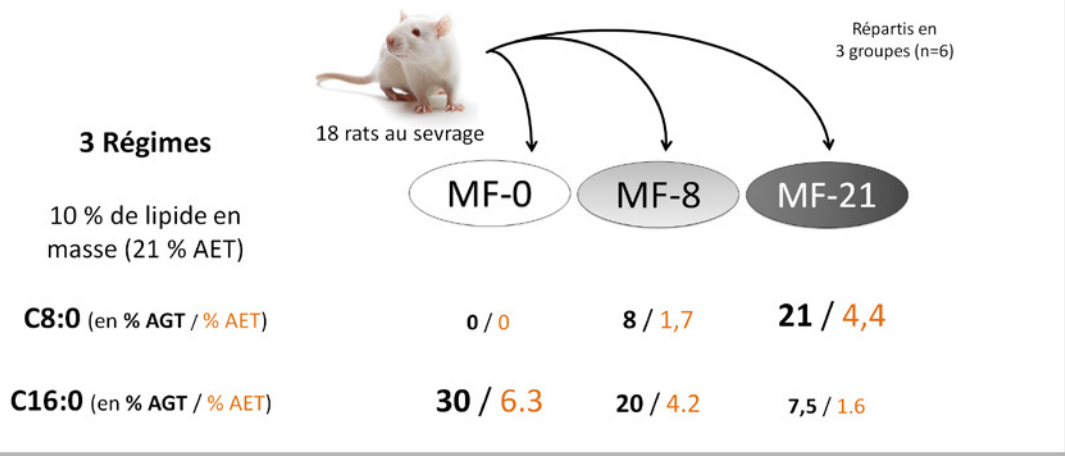
D. une étude moléculaire ayant pour but de mettre en place un essai de mesure d'activité de la GOAT, l'enzyme responsable de l'octanoylation de la ghréline, afin d'étudier sa régulation par différents acides gras.

Résultats et discussions

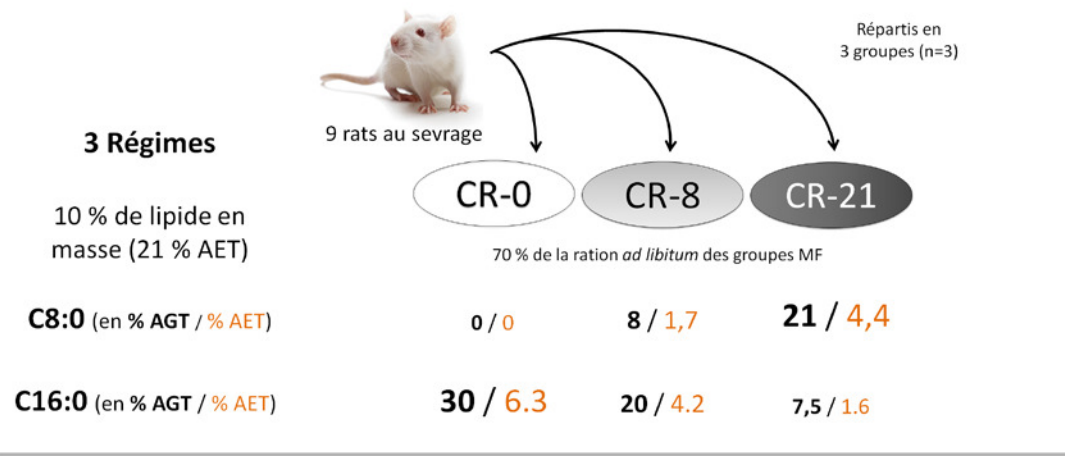
Partie A

A. Effets de la consommation chronique d'acide octanoïque à différentes doses sur l'axe ghréline-GOAT et sur le métabolisme lipidique

Groupes MF (moderate fat)



Groupes CR (calorie restriction)



Groupes HF (high fat)

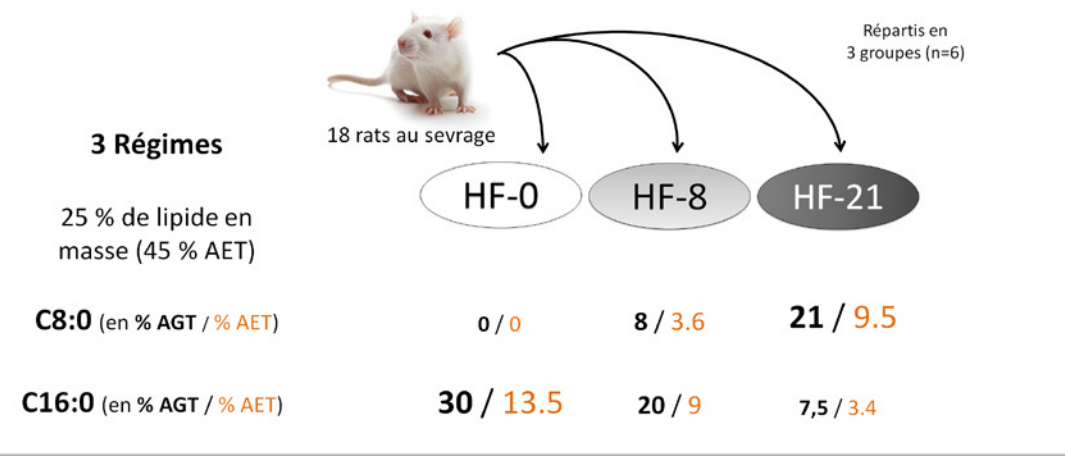


Figure 18. Représentation schématique des différents groupes de rats et conditions

La partie A présente l'approche physiologique adoptée afin d'étudier les effets de la dose d'acide octanoïque, consommée de manière chronique, sur l'octanoylation de la ghréline, les paramètres régulés par l'axe ghréline-Ghréline O-acyltransférase (GOAT) et sur le métabolisme lipidique. La 1^{ère} partie traite de l'effet du C8:0 sur l'axe ghréline-GOAT et les paramètres qu'il régule, sous la forme d'un article intitulé « Dietary caprylic acid (C8:0) does not increase plasma acylated ghrelin but decreases plasma unacylated ghrelin in the rat », publié dans PLoS ONE (Lemarié et al., 2015a). Une 2^{ème} partie présente les résultats complémentaires concernant l'effet de la consommation de C8:0 sur la composition tissulaire en acides gras et le métabolisme lipidique dans le foie et les tissus adipeux.

A.1. Effets de la consommation chronique de C8:0 à différentes doses sur la régulation de l'axe ghréline-GOAT

A.1.1. Contexte et présentation de l'étude

Depuis l'Étude des 7 pays, une étude épidémiologique d'observation traitant des problèmes cardiaques chez les Hommes, les matières grasses saturées alimentaires sont considérées comme responsables de l'augmentation de la cholestérolémie, favorisant l'apparition de plaques d'athérome augmentant les risques d'accidents cardio-vasculaires (Keys et al., 1966). Le rôle physiologique des acides gras saturés a longtemps été restreint à leurs effets négatifs, quand ils sont apportés en excès dans l'alimentation, ce qui explique leur mauvaise réputation nutritionnelle (Mensink et al., 1992). Ces résultats, bien que remis en cause depuis que les études nutritionnelles explorent des doses raisonnables d'acides gras totaux, ont largement contribué à masquer les autres fonctions biologiques de ces derniers (Siri-Tarino et al., 2010; Tholstrup et al., 2003). Chaque acide gras saturé possède des fonctions cellulaires spécifiques. Il est donc nécessaire de les considérer selon leur propre spécificité, leur origine alimentaire ainsi que selon la dose ingérée.

Comme décrit dans la synthèse bibliographique, les acides gras saturés à chaîne moyenne (AGCM) présentent des caractéristiques liées à leur structure moléculaire (6 à 10 carbones), notamment l'acide octanoïque (C8:0) qui est capable d'activer la ghréline en formant une liaison oxyester avec la Serine 3 N-terminale (octanoylation). La ghréline octanoylée, qui représente 10 à 50% de la ghréline totale dans le plasma, est la seule hormone orexigène

connue chez l'Homme. Elle joue un rôle dans le maintien de l'équilibre énergétique de l'organisme en agissant sur le déclenchement de la prise alimentaire, le métabolisme lipidique, l'homéostasie du glucose et sur le système digestif. Même si les effets observés des AGCM sur la satiété, la baisse de poids ou les taux de lipides circulants (triglycéride, cholestérol HDL et LDL) ne sont pas toujours identiques selon les études, ils sont souvent soit neutres, soit bénéfiques pour la santé et en faveur d'une perte de poids. L'acide octanoïque semble ainsi exercer un double rôle :

- 1) en temps qu'AGCM, il est rapidement utilisé dans le foie comme source d'énergie et est donc peu stocké dans les tissus adipeux
- 2) par sa fonction d'acylation de la ghréline, il active indirectement la prise alimentaire, favorise l'adiposité et la prise de poids, voire l'obésité.

Si certaines études ont montré que les AGCM d'origine alimentaire pouvaient être utilisés pour l'acylation de la ghréline (Nishi et al., 2005a), il n'y a pas d'étude sur la relation entre la dose de C8:0 consommée et l'effet sur l'axe ghréline-GOAT, en conditions physiologiques. Pourtant, l'importance de l'apport alimentaire en acide octanoïque, en supposant que cet acide gras ne soit pas entièrement β -oxydé dans le foie et atteigne les cellules où la ghréline est synthétisée et octanoylée, pourrait entraîner une augmentation de la disponibilité du co-substrat de l'octanoylation. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de comprendre l'effet de la dose d'acide octanoïque alimentaire sur les taux plasmatiques de ghréline octanoylée ou non octanoylée, et sur les paramètres contrôlés par l'axe ghréline-GOAT en regard des effets liés aux particularités métaboliques de cet acide gras en tant qu'AGCM.

Pour cela, des régimes iso-lipidiques et iso-saturés avec une dose croissante de C8:0 (0, 8 et 21 % des AGT) sous forme de trioctanoïne, compensée par une diminution en acide palmitique (C16:0), ont été donnés à des rats pendant 6 semaines. Le rôle de l'axe ghréline-GOAT dans la régulation de certains paramètres (telle que la glycémie) étant *a priori* dépendant de l'état nutritionnel (Zhao et al., 2010). Notre étude a été menée dans trois situations nutritionnelles : un apport lipidique modéré (10% de lipides en masse) en condition *ad libitum*, un apport lipidique modéré (10% de lipides en masse) en condition de restriction calorique (70% de la quantité d'aliment ingérée *ad libitum*) et un apport lipidique élevé (25% de lipides en masse) en condition *ad libitum* (**Figure 18**). L'âge semblant également être un

facteur déterminant dans le fonctionnement de l'axe ghréline-GOAT-GHSR-1a (Kang, 2011), le choix a été fait de réaliser l'étude directement après le sevrage des rats (période de croissance).

A.1.2. Article 1

Published: July 21, 2015 DOI: 10.1371/journal.pone.0133600

Dietary caprylic acid (C8:0) does not increase plasma acylated ghrelin but decreases plasma unacylated ghrelin in the rat

Fanny Lemarié¹, Erwan Beauchamp¹, Stéphanie Dayot¹, Cécile Duby¹, Philippe Legrand¹, Vincent Rioux^{1*}

¹ Laboratory of biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus Ouest-INRA (USC 1378), Rennes, France

Corresponding author: Pr. Vincent RIOUX, Laboratoire de Biochimie-Nutrition Humaine Agrocampus Ouest, INRA USC 1378, RENNES, France. Tel: +33 2 23 48 55 47; Fax: +33 2 23 48 55 50; e-mail address: Vincent.Rioux@agrocampus-ouest.fr

Abbreviations

CH, cholesterol; EIA, enzyme immunoassay; FAME, fatty acid methyl ester; FFA, free fatty acid; GH, growth hormone; GOAT, ghrelin O-acyltransferase; GHSR-1a, growth hormone secretagogue receptor 1a; IGF-1, insulin-like growth factor I; LCFA, long chain fatty acid; LCT, long chain triglyceride; MCFA, medium chain fatty acid; MCT, medium chain triglyceride; PPG, preproghrelin; PUFA, polyunsaturated fatty acid; TG, triglyceride.

Table 1. Fat mixture and fatty acid composition (% of FAs) of the experimental lipid blends containing increasing levels of caprylic acid (C8:0)

	Diet-0 %	Diet-8 %	Diet-21 %
Fat (%)			
Olive Oil	47.0	48.3	50.0
Rapeseed Oil	0.0	0.0	10.0
Palm Oil	19.0	17.0	0.0
Corn Oil	13.5	13.5	13.3
Flaxseed Oil	5.5	5.5	3.7
Tricaprylin	0.0	10.0	23.0
Tripalmitin	14.7	5.7	0.0
FA (% of FAs)			
C8:0	0.0	8.4	20.6
C12:0	0.1	0.1	0.0
C14:0	0.3	0.3	0.0
C16:0	30.0	19.8	7.6
C18:0	3.1	2.9	2.2
C20:0	0.3	0.3	0.3
C22:0	0.0	0.1	0.1
ΣSFA¹	33.8	31.8	30.9
C16:1 (n-9)	0.0	0.1	0.1
C16:1 (n-7)	0.4	0.4	0.4
C18:1 (n-9)	47.7	49.3	49.9
C18:1 (n-7)	1.7	1.6	1.9
C20:1 (n-9)	0.2	0.2	0.3
ΣMUFA¹	50.0	51.5	52.5
C18:2 (n-6)	12.7	13.2	13.1
C18:3 (n-3)	3.5	3.5	3.5
ΣPUFA¹	16.2	16.7	16.6
<i>C18:2/C18:3 ratio</i>	3.7	3.8	3.8

The three different lipid mixes were used for preparing the MF, CR and HF diets

¹ΣSFA, ΣMUFA and ΣPUFA correspond respectively to the sum of saturated, mono-unsaturated and poly-unsaturated fatty acids

Abstract

Focusing on the caprylic acid (C8:0), this study aimed at investigating the discrepancy between the formerly described beneficial effects of dietary medium chain fatty acids on body weight loss and the C8:0 newly reported effect on food intake *via* ghrelin octanoylation. During 6 weeks, Sprague-Dawley male rats were fed with three dietary C8:0 levels (0, 8 and 21% of fatty acids) in three experimental conditions (moderate fat, caloric restriction and high fat). A specific dose-response enrichment of the stomach tissue C8:0 was observed as a function of dietary C8:0, supporting the hypothesis of an early preduodenal hydrolysis of medium chain triglycerides and a direct absorption at the gastric level. However, the octanoylated ghrelin concentration in the plasma was unchanged in spite of the increased C8:0 availability. A reproducible decrease in the plasma concentration of unacylated ghrelin was observed, which was consistent with a decrease in the stomach preproghrelin mRNA and stomach ghrelin expression. The concomitant decrease of the plasma unacylated ghrelin and the stability of its acylated form resulted in a significant increase in the acylated/total ghrelin ratio which had no effect on body weight gain or total dietary consumption. This enhanced ratio measured in rats consuming C8:0 was however suspected to increase (i) growth hormone (GH) secretion as an increase in the GH-dependent mRNA expression of the insulin like growth Factor 1 (IGF-1) was measured (ii) adipocyte diameters in subcutaneous adipose tissue without an increase in the fat pad mass. Altogether, these results show that daily feeding with diets containing C8:0 increased the C8:0 level in the stomach more than all the other tissues, affecting the acylated/total ghrelin plasma ratio by decreasing the concentration of circulating unacylated ghrelin. However, these modifications were not associated with increased body weight or food consumption.

Table 2. Primers designed for quantitative RT-PCR analysis of rat genes

Genes	Preproghrelin (PPG)	IGF-1	GHSR-1a
Species	rat	rat	rat
GenBank Acc. no.	NM_021669.2	NM_001082479.1	NM_032075.3
Forward primer	TGGCATCAAGCTGTCAGGAG	AGTTCGTGTGTGGACCAAGG	GCCATCTGCTTCCCTCTG
Reverse primer	GGCAGAAGCTGGATGTGAGT	GGTGACGTGGCATTCTGT	ATCTGTGCCGTTTTCGTG
Amplicon size bp	171	312	144

Introduction

Caprylic acid (octanoic acid, C8:0) belongs to the class of medium-chain saturated fatty acids (MCFAs) which also includes caproic acid (C6:0) and capric acid (C10:0). MCFAs are characteristic nutrients present in dairy products (Jensen et al., 1990) and in specific oils like palm kernel and coconut oils (Takeuchi et al., 2008). They display physical and metabolic properties that are distinct from those of long-chain saturated fatty acids (LCFAs ≥ 12 carbons), leading therefore to distinct physiological effects (Bach et al., 1982). First, part of MCFAs coming from dietary medium chain triglycerides (MCTs) can be released early during digestion through the action of preduodenal lipase (Clark et al., 1969), leading to their potential and yet not clearly quantified direct absorption by the stomach mucosa (Lai et al., 1998; Perret, 1980). Second, MCFAs which have escaped the absorption at the gastric level are absorbed by small intestinal cells, like LCFAs, after the subsequent action of duodenal pancreatic lipase on both dietary remaining MCTs and long chain triglycerides (LCTs). However, unlike LCFAs which are re-esterified with 2-monoglycerides into triglycerides and incorporated into chylomicrons which enter the lymphatic system, MCFAs are directly transferred to the portal circulation and transported as free fatty acids (FFAs) with albumin to the liver (You et al., 2008). Third, once in the liver, MCFAs are rapidly subjected to mitochondrial β -oxidation (Ooyama et al., 2009), since they easily enter the mitochondria independently of the carnitine transport system, as opposed to LCFAs (Papamandjaris et al., 1998).

These metabolic properties of MCFAs (rapid gastro-intestinal hydrolysis and absorption, specific transport through the portal vein and rapid β -oxidation in the liver) lead to a high catabolism and low tissue storage especially in adipose tissue (Bach et al., 1996). Dietary MCFAs have therefore been associated with beneficial physiological effects compared with LCFAs. Indeed, a diminished deposition of fat was reported in rats overfed with MCT diets compared with LCT diets (Baba et al., 1987; Geliebter et al., 1983; Han et al., 2003). In overweight humans, intakes of equal-caloric diets rich in MCFAs were shown to decrease adiposity and increase energy expenditure compared to similar diets rich in LCFAs (St-Onge et al., 2008; Tsuji et al., 2001). Regarding other physiological parameters, epidemiological

Table 3. Effect of dietary tricaprylin (0, 8, 21 % of FAs) in the MF groups on the C8:0 availability in different tissues

Diets	C8:0 in % FA			K-W test
	MF-0	MF-8	MF-21	
Plasma	n.d. ¹	n.d.	n.d.	n.s. ²
Liver	n.d.	n.d.	n.d.	n.s.
Mesenteric adipose tissue	n.d.	0.15 ± 0.00	0.25 ± 0.01	*
Subcutaneous adipose tissue	n.d.	0.15 ± 0.01	0.26 ± 0.02	
Epididymal adipose tissue	n.d.	0.19 ± 0.01	0.32 ± 0.01	*
Stomach	0.07 ± 0.03	0.48 ± 0.07	1.22 ± 0.25	**
Duodenum	n.d.	0.14 ± 0.01	0.43 ± 0.09	*
Jejunum	n.d.	0.12 ± 0.03	0.30 ± 0.12	n.s.
Ileum	n.d.	n.d.	n.d.	n.s.

*Results are expressed as mean ± SEM in % of FAs in the tissues
Kruskal-Wallis test (K-W test) *P<0.05, **P<0.01*

¹ not detected

² statistically not significant

studies have also shown that intakes of short to medium-chain saturated fatty acids were not significantly associated with the risk of coronary heart disease (CHD) (Hu et al., 1999).

However, more recently, caprylic acid was also shown to specifically acylate ghrelin (Kojima et al., 1999), the only known peptide hormone with an orexigenic effect. Ghrelin is a 28 amino acid peptide expressed mainly in the different sections of the digestive tract and especially the stomach (Hosoda et al., 2000b). Acylated ghrelin binds to the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHSR-1a) located in the pituitary gland and hypothalamus (Howard et al., 1996; Wang et al., 2014) and regulates many relevant biological processes including the secretion of the growth hormone (GH), the stimulation of appetite and food intake, the modulation of gastric acid secretion and motility and the regulation of glucose homeostasis and adiposity (Delporte, 2013). Ghrelin seems to have an essential function in blood glucose regulation in case of calorie restriction (Zhao et al., 2010), even if the mechanisms mediating this effect remain poorly understood. During its maturation in the gastric mucosa and before secretion in the blood, part of the proghrelin is subjected to a unique modification consisting in the addition of an activated caprylic acyl-coA to the 3rd serine residue. The ghrelin O-acyltransferase (GOAT or MBOAT4), the gastric enzyme involved in ghrelin octanoylation, belongs to the family of membrane bound O-acyltransferases (MBOAT), a group of proteins involved in acetyltransferase and acyltransferase activity (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008a). Plasma ghrelin exists therefore in both unacylated and acylated forms, but only the latter can bind its GHSR-1a receptor. Because of the above-mentioned potential specific gastric absorption of MCFAs following the consumption of MCTs, dietary caprylic acid is now suspected to directly provide GOAT enzyme with octanoyl-CoA co-substrate necessary for the acyl modification of ghrelin. Indeed, ingestion by mice of either MCFAs or MCTs increased the stomach concentration of acylated ghrelin (Nishi et al., 2005a), without changing the total ghrelin amount. Using murine genetic models, Kirchner et al. (2009) also suggested that GOAT was required to mediate the impact of dietary MCTs on body adiposity. Recent studies have suggested that GOAT might be a therapeutic target against obesity and hyperphagia by inhibiting the GOAT activity (Barnett et al., 2010), in order to decrease the circulating level

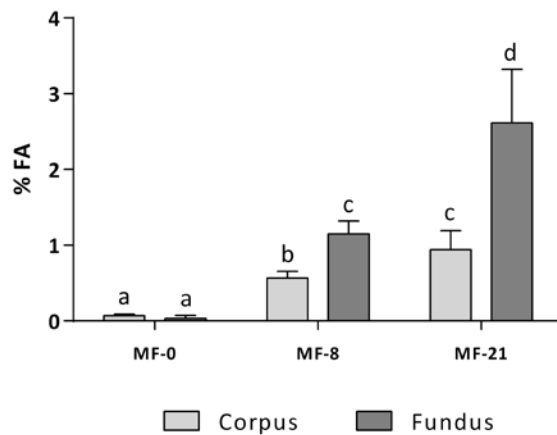


Figure 1. Effect of dietary tricaprylin level in the MF groups on C8:0 availability in the stomach tissue

The stomach tissue was dissected and the fatty acids of the fundus and corpus were analyzed. The C8:0 available in the different parts of the stomach is expressed as mean \pm SEM in % of FAs in the tissues. The effect of the diet and the localization in the stomach tissue was analyzed using two-way ANOVA: (i) effect of the diet on C8:0 availability, $P < 0.0001$; (ii) effect of the part of the stomach tissue studied on C8:0 availability, $P = 0.0092$; (iii) interaction between the two factors, $P = 0.0387$.

S1 Table. Effect of the diets in the MF groups on the C16:0 availability in different tissues

Diets	C16:0 in % FA			K-W test
	MF-0	MF-8	MF-21	
Plasma	23.73 \pm 0.69	23.68 \pm 0.46	22.50 \pm 0.48	-
Liver	28.66 \pm 1.56	29.15 \pm 1.30	28.08 \pm 1.58	-
Mesenteric adipose tissue	27.13 \pm 0.21	26.10 \pm 0.40	23.92 \pm 0.80	**
Subcutaneous adipose tissue	26.81 \pm 0.39	26.15 \pm 0.35	23.69 \pm 0.71	**
Epididymal adipose tissue	27.07 \pm 0.43	25.95 \pm 0.76	24.22 \pm 0.92	-
Stomach	23.96 \pm 0.56	22.53 \pm 0.80	21.95 \pm 0.52	-
Duodenum	21.72 \pm 0.27	20.94 \pm 0.49	21.36 \pm 0.51	-
Jejunum	24.37 \pm 0.45	24.45 \pm 0.63	22.89 \pm 0.54	-
Ileum	23.98 \pm 0.68	24.53 \pm 0.43	23.01 \pm 0.42	-

Results expressed as mean \pm SEM

of acylated ghrelin (which may also be obtained by limiting the availability of its substrate C8:0) (Barnett et al., 2010).

Altogether, these data support contradictory physiological effects of dietary caprylic acid on body weight and food consumption. We therefore wanted to clarify the discrepancy between the historically described beneficial effects of dietary MCFAs including C8:0 on body weight and fat loss and its newly reported effect on food consumption and appetite stimulation *via* ghrelin acylation. The purpose were to (i) define the origin of caprylic acid which is used to acylate ghrelin in the stomach, (ii) study the effect of increasing dietary caprylic acid levels on the C8:0 available in the stomach and other tissues, (iii) analyze the subsequent effect of increasing dietary caprylic acid levels on the concentration of circulating plasma acylated and non-acylated ghrelin, (iv) study the whole effect of increasing dietary caprylic acid levels on dietary consumption, body weight and on other parameters such as adiposity. Here, we showed that dietary C8:0 led to a specific dose-response enrichment of C8:0 in the stomach tissue. However, this increased C8:0 availability did not affect the plasma acylated ghrelin concentration but decreased the plasma unacylated ghrelin concentration.

Materials and methods

Chemicals

Solvents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) or Thermo Fisher Scientific (Elancourt, France). Tricaprylin was from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). Tripalmitin was from Sigma. Rat plasma acylated and unacylated ghrelin enzyme immunoassays kits (EIA) were purchased from SPI-Bio (Montigny Le Bretonneux, France). Kits for plasma glucose, cholesterol and triglycerides were purchased from Bio-mérieux (Lyon, France). Rabbit anti-ghrelin polyclonal antibodies (bs-0467R) used for immunohistochemistry were purchased from Bioss (Massachusetts, USA).

Diets

Three different lipid mixes (**Table 1**) were prepared with commercial oils (olive, rapeseed, palm, corn and flaxseed oils) and increasing amounts of caprylic acid (0, 8 and 21% of FAs) in the form of tricaprylin substituted with decreasing amounts of palmitic acid (30, 20 and

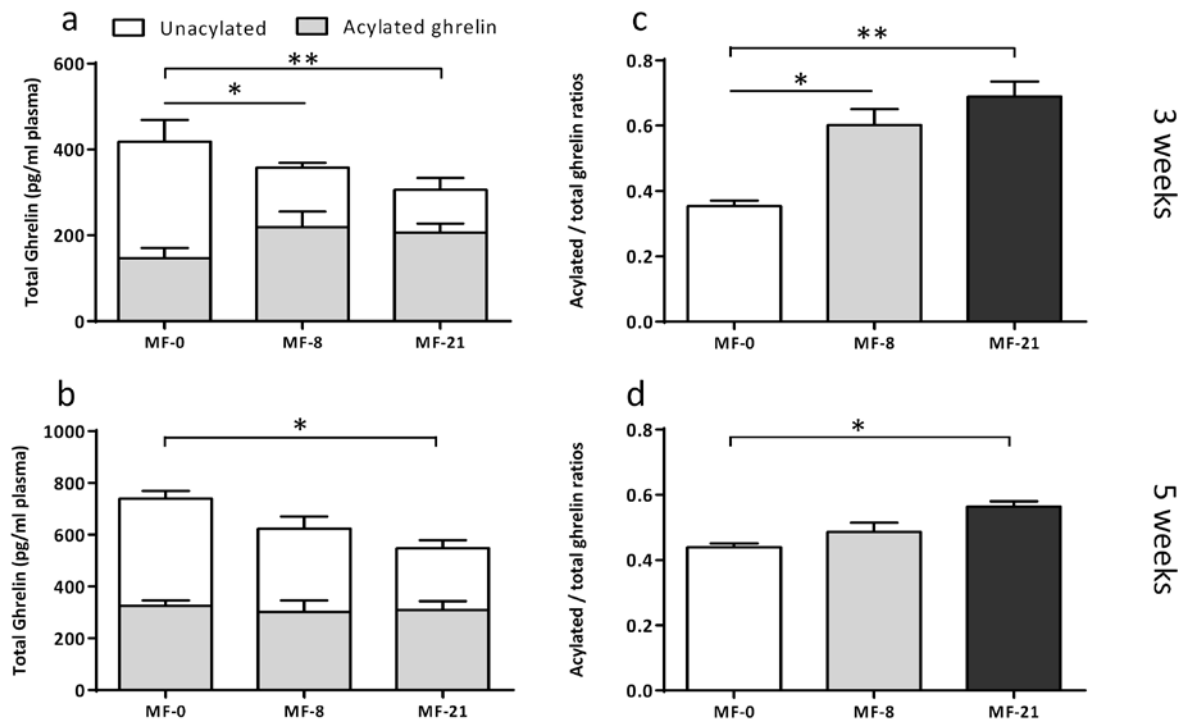


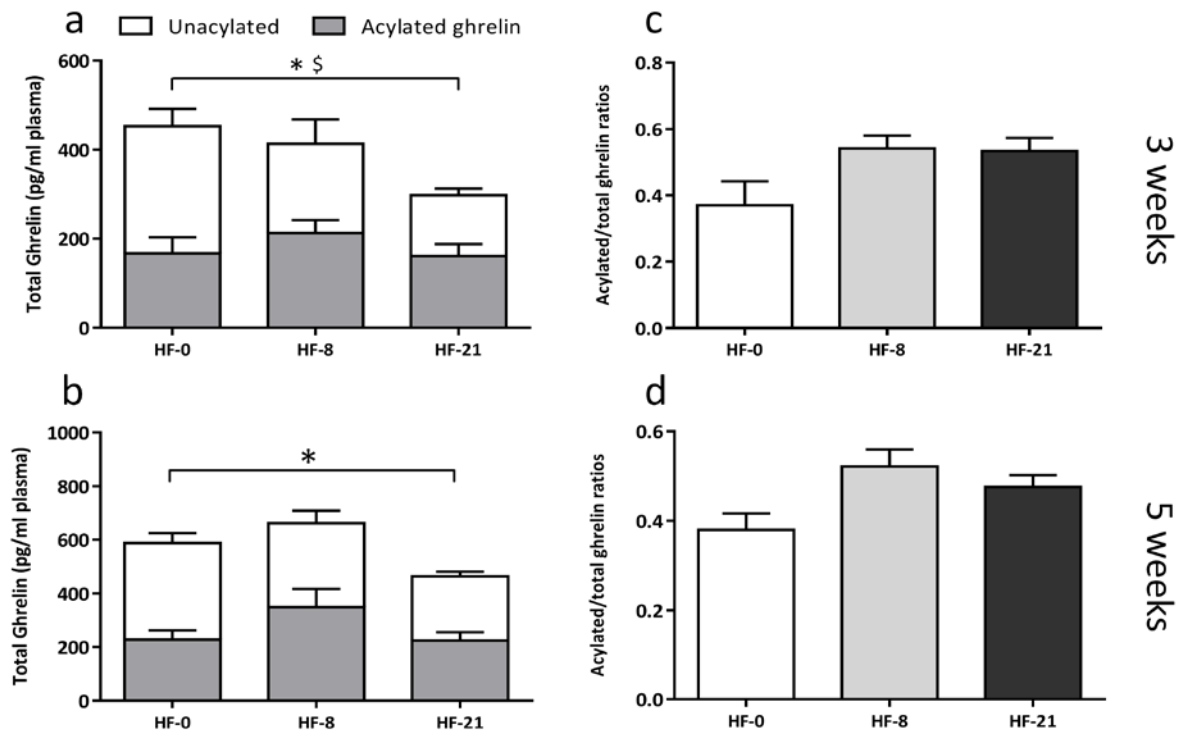
Figure 2. Effect of dietary tricaprylin level on the plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations, in the MF groups, fed state

(a) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 3 weeks of diet. Kruskal-Wallis test (K-W): (i) acylated ghrelin, $P=0.44$; (ii) unacylated ghrelin, $P=0.0018$, Dunn's post tests, $*P<0.05$, $**P<0.01$; (iii) total ghrelin, $P=0.5824$. (b) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 5 weeks of diet. K-W test: (i) acylated ghrelin, $P=0.56$; (ii) unacylated ghrelin, $P=0.029$, Dunn's post tests, $*P<0.05$; (iii) total ghrelin, $P=0.127$. (c) Acylated/total ghrelin ratios after 3 weeks of diet. K-W test: $P=0.006$, Dunn's post tests, $*P<0.05$, $**P<0.01$. (d) Acylated/total ghrelin ratios after 5 weeks of diet. K-W test: $P=0.0103$, Dunn's post tests, $*P<0.05$.

7.5% of FAs) in the form of tripalmitin. These lipid mixes were used to prepare diets containing either moderate amounts of fat called MF diets (10% in mass, *i.e.* 21% of total energy), or high amounts of fat called HF diets (25% in mass, *i.e.* 45% of total energy), at the Unité de Production d'Aliments Expérimentaux (INRA, Jouy en Josas, France). The three MF diets (MF-0, MF-8 and MF-21) also contained 42.2% of starch, 21.1% of sucrose, 19.9% of casein, 1.8% of cellulose, 4.1% of mineral mix and 0.9% of vitamin mix. These MF diets were isoenergetic (423 kcal/100 g) and contained the same amount of total saturated fatty acids (SFAs), caprylic acid representing 0, 1.7 and 4.4% of total energy, respectively. The MF diets were provided *ad libitum* to the rats but also as calorie restricted rations (CR diets) corresponding to 70% of *ad libitum* and thereafter called CR-0, CR-8 and CR-21 diets. Finally, in the three HF diets (HF-0, HF-8 and HF-21) containing 25% in mass of fat, the increase in fat level was counterbalanced with a decrease in starch (32.2%) and sucrose (16.1%). These HF diets were also isoenergetic (498 kcal/100 g), caprylic acid representing 0, 3.6 and 9.5% of total energy, respectively.

Animals

All protocols complied with the European Union Guideline for animal care and use (2003/35/CEE). The experimental procedure (n°01374.02) was approved by the French Animal Care Committee (Rennes) and the Ministry of Higher Education and Research, in compliance with recommendations of the 2013-118 directive for animal experimentation. Forty five Sprague-Dawley male rats (60 g weight) were purchased from Janvier breeding center (Le Genest Saint Isle, France). Eighteen rats were randomly distributed to 3 groups (n=6) and fed *ad libitum* with the three MF diets (MF-0, MF-8 and MF-21). As mentioned above, three other groups of rats (n=3) received the same MF diets restricted to 70% of *ad libitum* and were called CR groups (CR-0, CR-8 and CR-21). The n value of the CR groups was limited to 3 rats due to housing restriction. Finally, three other groups of rats (n=6) were fed *ad libitum* with the HF diets (HF-0, HF-8 and HF-21). The nine different groups of rats were fed during 6 weeks with the experimental diets. They had free access to water. Rats were housed in groups of two (MF and HF diets) or alone (CR diets) at 19 °C-23 °C with a 12 h light-dark cycle.



S1 Figure. Effect of tricaprylin on acylated and unacylated ghrelin concentrations in HF groups, fed state

(a) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 3 weeks of diet. Kruskal-Wallis test (K-W): (i) acylated ghrelin, $P=0.201$; (ii) unacylated ghrelin, $P=0.04$, Dunn's post tests, * $P<0.05$; (iii) total ghrelin, $P=0.033$, Dunn's post tests, $^{\$}P<0.05$. (b) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 5 weeks of diet. K-W test: (i) acylated ghrelin, $P=0.304$; (ii) unacylated ghrelin, $P=0.023$; Dunn's post tests, * $P<0.05$; (iii) total ghrelin, $P=0.2938$. (c) Acylated/total ghrelin ratios after 3 weeks of diet. K-W test: $P=0.0669$. (d) Acylated/total ghrelin ratios after 5 weeks of diet. K-W test: $P=0.0653$.

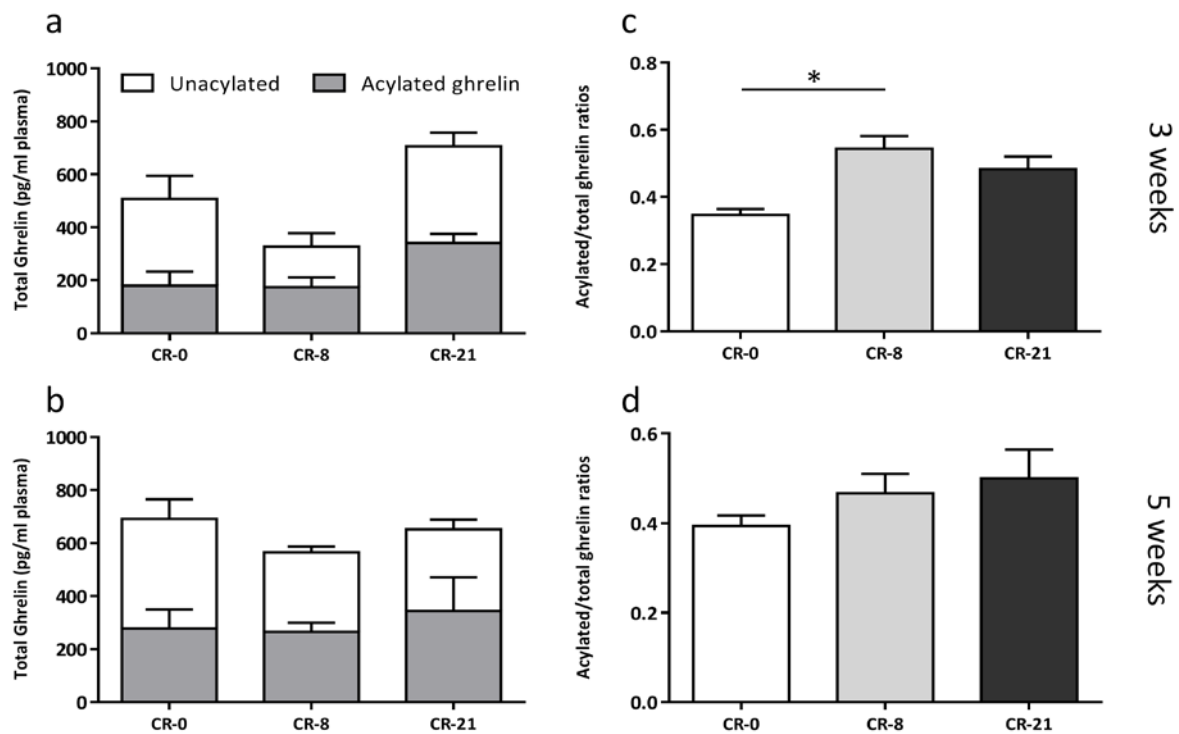
Animal weight and food consumption were measured daily. Blood samples were collected every week starting from the second week of diets (between 8 and 11 am) in the tail vein alternatively on 18 h fasted (2nd and 4th weeks) or fed state (3rd and 5th weeks) in order to measure the plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations. For ethical reasons, rats already under chronic calorie restriction were not additionally deprived of food and no results are therefore presented for the CR group under fasted conditions. After 6 weeks of experiment, rats were anesthetized following an overnight fast with an intraperitoneal injection of pentobarbital (140 mg/kg) (Merial, Lyon, France) and blood samples were collected by cardiac punctures. The liver, the brain, the mesenteric and the subcutaneous adipose tissues were removed, weighted, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Sections of subcutaneous adipose tissues were directly fixed in formalin for morphometric analysis. The intestine (duodenum, jejunum and ileum) was emptied, rinsed with ice-cold saline solution, snap-frozen and stored at -80 °C. The stomach was subsequently removed and treated similarly. Stomach longitudinal sections were collected and fixed in formalin for immunohistology.

Measurement of the plasma acylated and unacylated ghrelin

Blood samples collected in the tail vein were immediately mixed with EDTA (1 mg/mL plasma) and with the serine protease inhibitor p-hydroxymercuribenzoic acid (PHMB, 0.4 µM final) to protect the acylated ghrelin from enzymatic degradation (Hosoda et al., 2012). The plasma was rapidly separated from the blood cells by centrifugation and acidified by adding HCl (0.1 N final) to preserve ghrelin acylation, as well. Samples were then stored at -80 °C for later hormone titration. The acylated and unacylated ghrelin concentrations were assayed with the commercial EIA kits (Chen et al., 2012) according to the manufacturer's instructions.

Analysis of the other plasma parameters

The plasma collected by cardiac punctures at the end of the experiment was separated from the blood cells by centrifugation. Plasma glucose, cholesterol and TG were assayed with commercial enzymatic kits according to the manufacturer's instructions.



S2 Figure. Effect of tricaprylin on acylated and unacylated ghrelin concentrations in CR groups, fed state

(a) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 3 weeks; Kruskal-Wallis test (K-W): (i) acylated ghrelin, $P=0.0714$; (ii) unacylated ghrelin, $P=0.1321$; (iii) total ghrelin, $P=0.1321$. (b) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 5 weeks; K-W test: (i) acylated ghrelin, $P=0.9929$; (ii) unacylated ghrelin, $P=0.6286$; (iii) total ghrelin, $P=0.9929$. (c) Acylated/total ghrelin ratios after 3 weeks; K-W test, $P=0.0250$, Dunn's post tests, $*P<0.05$. (d) Acylated/total ghrelin ratios after 5 weeks; K-W test, $P=0.2071$.

Lipid extraction and FA analysis

Lipids from liver, stomach, duodenum, jejunum, ileum, epididymal, mesenteric and subcutaneous adipose tissues were extracted using a mixture of dimetoxymethane/methanol (4:1 v/v) after homogenization with an Ultra-Turrax® as previously described (Guillou et al., 2002). Lipids from plasma were extracted with a mixture of hexane/isopropanol (3:2 v/v), after acidification with 1 mL HCl 3 M (Rioux et al., 2005). Pelargonic acid (C9:0) and margaric acid (C17:0) were added as internal standards in order to quantify MCFAs (with C9:0) and LCFAs (with C17:0). Total lipid extracts were saponified for 30 min at 70 °C with 1 mL of 0.5 M NaOH in methanol and methylated with 1mL BF₃ (14% in methanol) for 15 min at 70 °C. To protect the presence of volatile short and medium chain FAs, FA methyl esters (FAMES) were extracted by adding 1 mL hexane and 5 mL NaCl 0.9% in deionized water (Ezanno et al., 2014). After shaking, the hexane phase was directly analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) (Rioux et al., 2013) using an Agilent Technologies 7890N (BiosAnalytic, Toulouse, France) with a split injector (10:1) at 250 °C and a bonded silica capillary column (BPX70, 60 m×0.25 mm, SGE, Villeneuve-St-Georges, France). The column temperature program started at 45 °C and stayed at this temperature for 3 min in order to analyze MCFAs. Then, the temperature ramped firstly at 10 °C/min to 150 °C, then at 1.4 °C/min to 220 °C and at 40 °C/min to 260 °C and held at 260 °C for 2 min.

Quantification of mRNA expression by Real-Time PCR

Total RNA was extracted from stomach, hypothalamo-pituitary complex, mesenteric adipose tissue and liver with Trizol®. RNA was converted into cDNA with the IScriptcDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to the supplier's instructions. RNA was quantified by real-time qPCR with the SsoFast EvaGreen supermix® (Bio-Rad) containing 50 ng of retrotranscribed RNA, 300 nM of Forward primers and 300 nM of Reverse primers and 10 µL SsoFast EvaGreen supermix®. The sequences of primers were designed as described in **Table 2**. Quantitative real-time PCR was done in optical 96-well plates on a CFX 96 real-time PCR Detection System (BioRad) as follows: 30 s at 95 °C, 40 cycles of 5 s at 95 °C and 5 s at 55 °C. The 18S mRNA level was quantified as an endogenous control.

Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT, MBOAT4) mRNA was quantified by Real-Time PCR with the Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem) containing 40 ng of

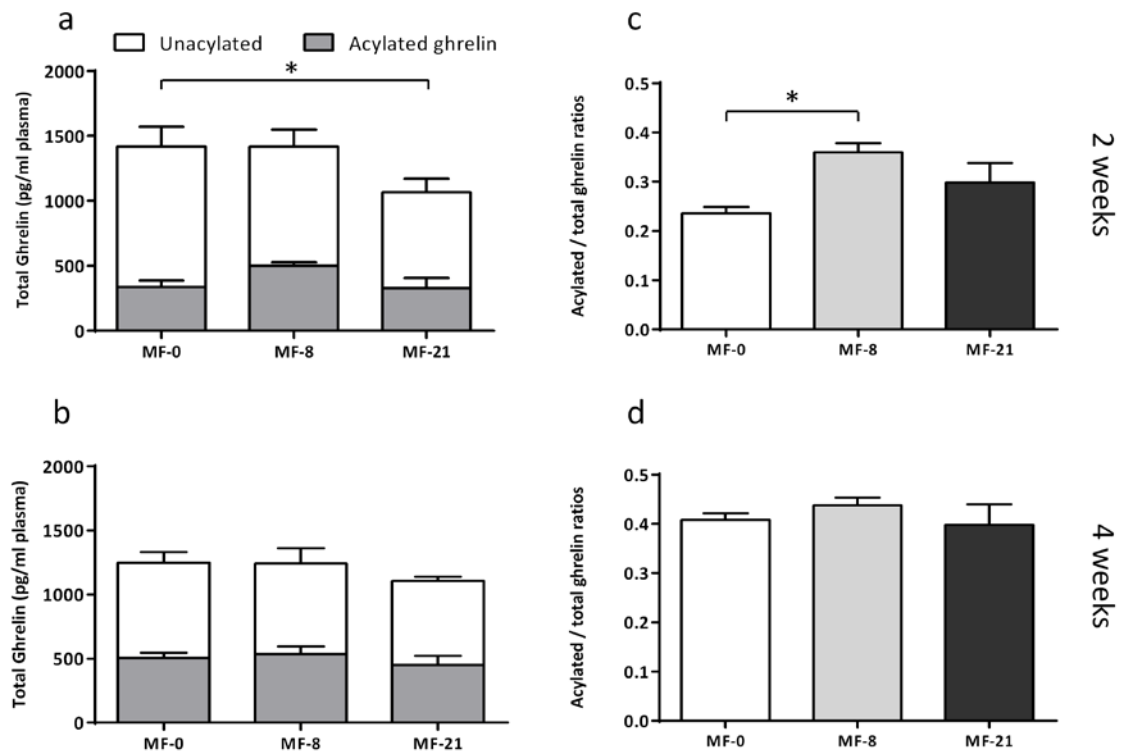


Figure 3. Effect of dietary tricaprylin level on the acylated and unacylated ghrelin concentrations, in the MF groups, fasted state

(a) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 2 weeks of diet. Kruskal-Wallis test (K-W): (i) acylated ghrelin, $P=0.0837$; (ii) unacylated ghrelin, $P=0.038$, Dunn's post tests, $*P<0.05$; (iii) total ghrelin, $P=0.2345$. (b) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 4 weeks of diet. K-W test: (i) acylated ghrelin, $P=0.4585$; (ii) unacylated ghrelin, $P=0.5643$; (iii) total ghrelin, $P=0.65$. (c) Acylated/total ghrelin ratios after 2 weeks of diet. K-W test: $P=0.0181$, Dunn's post tests, $*P<0.05$. (d) Acylated/total ghrelin ratios after 4 weeks of diet. K-W test: $P=0.3635$.

retrotranscribed RNA, 0.5 μ M of primers and 0.25 μ M of Taqman probe. Primers and 5'-FAM/TAMRA-3' Taqman probes specific to GOAT gene were designed (forward primer 5'-gggccaggtaccttttctc-3'; reverse primer 5'-cggccaaagccaggacaccct-3') and Taqman probe (5'-FAM-aaatgagcagagcgtaggga-TAMRA3'). Amplification was performed by an ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) over 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The *18S* gene expression was quantified as an endogenous control using the 18S RNA Control kit Yakima-Yellow Eclipse Dark Quencher (Eurogentec) and relative gene expression was determined from the cycle thresholds (Ct) using the $\Delta\Delta$ Ct method.

Determination of adipocyte size (morphometric analysis)

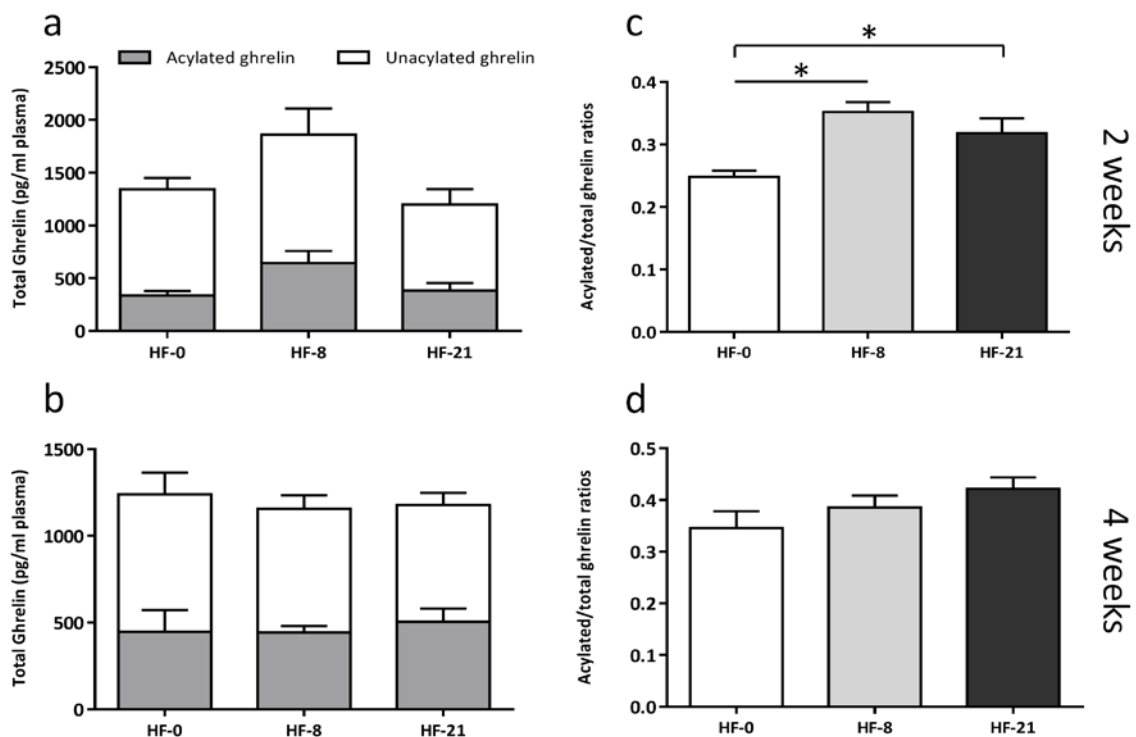
Subcutaneous adipose tissue was fixed with 4% buffered formalin, pH 7.4, during 1 week at 4 °C and embedded in paraffin (Kubota et al., 1999; Yamauchi et al., 2001). Three 4 μ m sections per rat shifted by 150 μ m were cut using a microtome LEICA (Milton Keynes, UK) and the sections were mounted onto glass slides and stained in Hemalun-Eosin-Safran (H.E.S). The adipocyte areas were manually traced and analyzed using the NIS Elements software. Adipocyte diameter, area and perimeter were calculated for 5 separate photographs per tissue sections. These data were used to calculate the frequency distribution of adipocyte diameters and the mean diameter.

Immunohistochemistry

Longitudinal stomach sections were fixed with 4% buffered formalin, pH 7.4, during 24 hours and embedded in paraffin (Knockaert et al., 2011). Paraffin-embedded tissue was cut at 4 μ m and slides were mounted onto glass slides. Immunohistochemistry was performed with rabbit polyclonal ghrelin (acylated and unacylated) antibodies, targeting an amino-acid sequence of the ghrelin which does not include the octanoylation site. Immunohistochemical staining was performed on Automated IHC stainer using the LEICA ST502. The signal was counted using the NIS elements software.

Statistical analysis

Statistical analyses were realized using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Group differences were analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis



S3 Figure. Effect of tricapylin on acylated and unacylated ghrelin concentrations in HF groups, fasted state

(a) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 2 weeks; Kruskal-Wallis test (K-W): (i) acylated ghrelin, $P=0.0958$; (ii) unacylated ghrelin, $P=0.5380$; (iii) total ghrelin, $P=0.3532$. (b) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 4 weeks; K-W test: (i) acylated ghrelin, $P=0.6808$; (ii) unacylated ghrelin, $P=0.8580$; (iii) total ghrelin, $P=0.9826$. (c) Acylated/total ghrelin ratios after 2 weeks; K-W test, $P=0.0076$, Dunn's post tests, $*P<0.05$, $**P<0.01$. (d) Acylated/total ghrelin ratios after 4 weeks, K-W test, $P=0.2248$.

test with the Dunn's post-tests or with non-parametric Mann-Whitney test to compare the amount of C8:0 between two sections of the stomach. A two-way ANOVA (not repeated measures) was used to analyze the effect of the diet and the localization in the stomach (fundus or corpus) on the C8:0 availability, and the effect of the tricaprylin on the frequency distribution of adipocyte diameter. Body weight gain was analyzed using the two-way ANOVA with repeated measures. All Data are expressed as the mean \pm SEM and for all tests, $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

C8:0 availability in the stomach, intestine and other tissues

The effect of dietary C8:0 (0, 8 and 21% of FAs) was studied in rats subjected to three different treatments: *ad libitum* Moderate Fat (MF) diet, Calorie Restricted (CR) diet (70% of MF *ad libitum* energy intake) and *ad libitum* High Fat (HF) diet. The composition of total FAs was analyzed in several tissues to determine the metabolic fate of dietary C8:0. The amount of C8:0 expressed as % of FAs in the tissues of MF rats is shown in **Table 3**. Regardless its amount in the diets, no C8:0 was detected in the plasma and in the liver of rats consuming the MF diets. In adipose tissues, the amount of C8:0 significantly increased with the level of dietary C8:0 but only reached about 0.3% of total FAs in the MF-21 group. In the stomach tissue, a clear dose-response enrichment of C8:0 was observed. Interestingly, even if no C8:0 was present in the MF-0 diet, a very low but detectable amount of this specific FA was found in the stomach tissue. In the stomach of the MF-8 and MF-21 rats, the percentage of C8:0 (in % of FAs) was 3 to 4-fold greater than in adipose tissues of the same animals. Although lower than in the stomach, a dose-dependent increase in C8:0 concentration was also observed in the first sections of the intestine (duodenum and jejunum). Finally, the FA analysis of the two parts of the stomach (fundus and corpus) was realized in the MF groups (**Fig. 1**) and showed again a dose-dependent increase in C8:0, the level of C8:0 being significantly higher in the fundus than in the corpus.

Concerning palmitic acid (**S1 Table**), the higher level of dietary C16:0 in MF-0 rats led to a significant increase in the % of C16:0 only in mesenteric and subcutaneous adipose tissues,

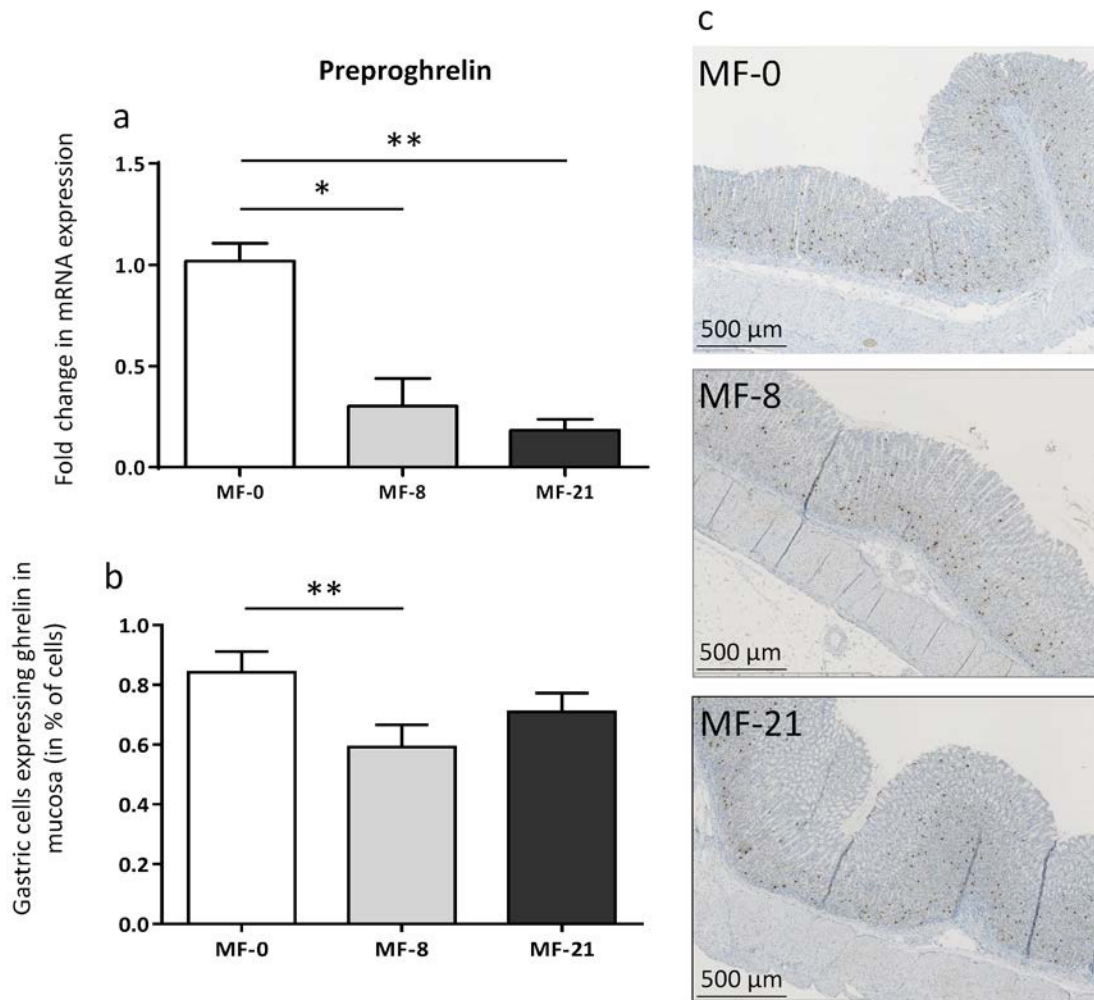


Figure 4. Effect of tricaprylin on total ghrelin expression in the MF groups

(a) Preproghrelin mRNA level (in fold change of the control MF-0) in the stomach tissue. Kruskal-Wallis (K-W) test: $P=0.004$, Dunn's post tests, $*P<0.05$, $**P<0.01$. (b) Quantification of total ghrelin staining in the gastric mucosa of the corpus. K-W test: $P=0.017$, Dunn's post tests, $**P<0.01$. (c) Ghrelin staining in gastric mucosa of MF-0, MF-8 and MF-21 groups.

compared to MF-8 and MF-21 rats. The lower intake in palmitic acid in MF-8 and 21 diets was likely compensated by an increased endogenous synthesis of this FA.

Plasma acylated and unacylated ghrelin

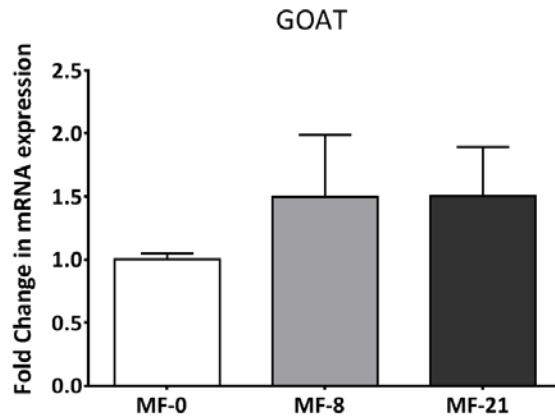
Under fed conditions

The plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations were measured in the blood collected on rats under fed conditions after 3 and 5 weeks on the experimental diets (**Fig. 2**). The plasma total ghrelin was calculated by adding the acylated and unacylated ghrelin concentrations. After 3 weeks (**Fig. 2a**) and 5 weeks (**Fig. 2b**), the acylated ghrelin concentration was not modified by the dietary C8:0 levels. Conversely the concentration of unacylated ghrelin was significantly lower in the MF-8 and MF-21 groups than in the control group after 3 weeks (**Fig. 2a**) and significantly lower in the MF-21 group than in the control group after 5 weeks (**Fig. 2b**). Due to the lower levels of unacylated ghrelin, the total ghrelin concentration was also decreased when C8:0 was present in the diets. As a consequence, the acylated to total ghrelin ratios were significantly higher (**Fig. 2c**) in the MF-8 and MF-21 groups than in the control group after 3 weeks and significantly higher in the MF-21 group compared with the control group with intermediate level for the MF-8 group after 5 weeks (**Fig. 2d**).

Plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations were similarly measured in the blood collected on fed rats of the HF groups (**S1 Fig.**). Once again, no effect of dietary C8:0 was shown on the acylated ghrelin concentrations but a significantly lower level of unacylated ghrelin concentrations was detected in the HF-21 group than the HF-0 group. In the CR groups, the C8:0 dietary level did not modify significantly the concentration of acylated and unacylated ghrelin whatever the diet duration (**S2 Fig.**).

Under fasted conditions

The plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations were also measured in the blood collected on rats under fasted conditions after 2 and 4 weeks on the experimental diets (**Fig. 3**). **Figs 3a and b** show that the concentrations of both acylated and unacylated ghrelin were significantly higher when MF rats were under fasted conditions than under fed



S4 Figure. Effect of C8:0 in the MF groups on stomach GOAT (MBOAT4) expression

GOAT mRNA level (in fold change). K-W test, $P > 0.05$. Results are expressed as mean \pm SEM.

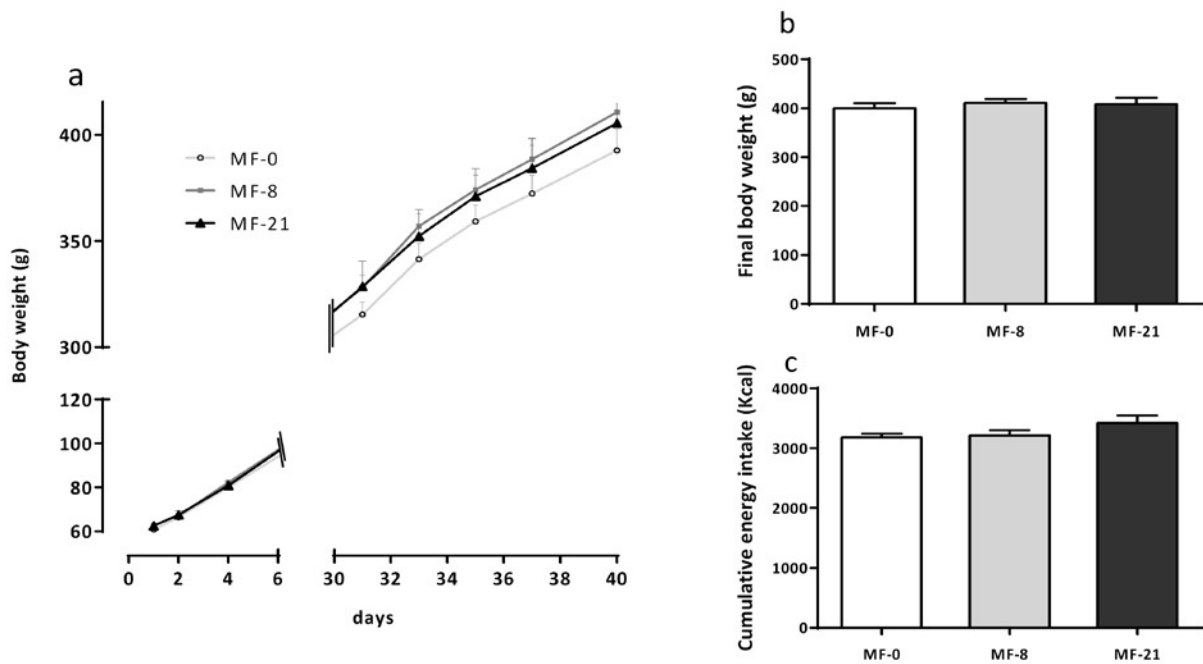


Figure 5. Effect of tricaprylin on body weight gain and food intake in the MF groups

(a) Body weight gain in gram. Two-way repeated measurement ANOVA: effect of the diet, $P = 0.5275$. (b) Final body weight in gram; Kruskal-Wallis (K-W) test: $P = 0.9098$. (c) Cumulative energy intakes in kcal. K-W test: $P = 0.3393$. Results are expressed as mean \pm SEM.

conditions (Fig. 2). Whatever the diet duration, the plasma acylated ghrelin concentration was not significantly modified by the consumption of C8:0. After 2 weeks, the unacylated ghrelin concentration was significantly lower in the MF-21 than in MF-0 group (Fig. 3a), as already shown under fed conditions. A similar but not significant downward trend was shown after 4 weeks (Fig. 3b). Consequently, a significant increase in the acylated/total ghrelin ratio was shown after 2 weeks between the MF-8 and MF-0 (Fig. 3c), but this effect disappeared gradually after longer dietary periods (Fig. 3d), as also shown previously under fed conditions.

Concerning the rats of the HF groups under fasted conditions (S3 Fig.) no significant effect of the C8:0 dietary level was shown after 2 and 4 weeks on acylated or unacylated ghrelin concentrations.

Stomach PPG mRNA level and ghrelin peptide expression

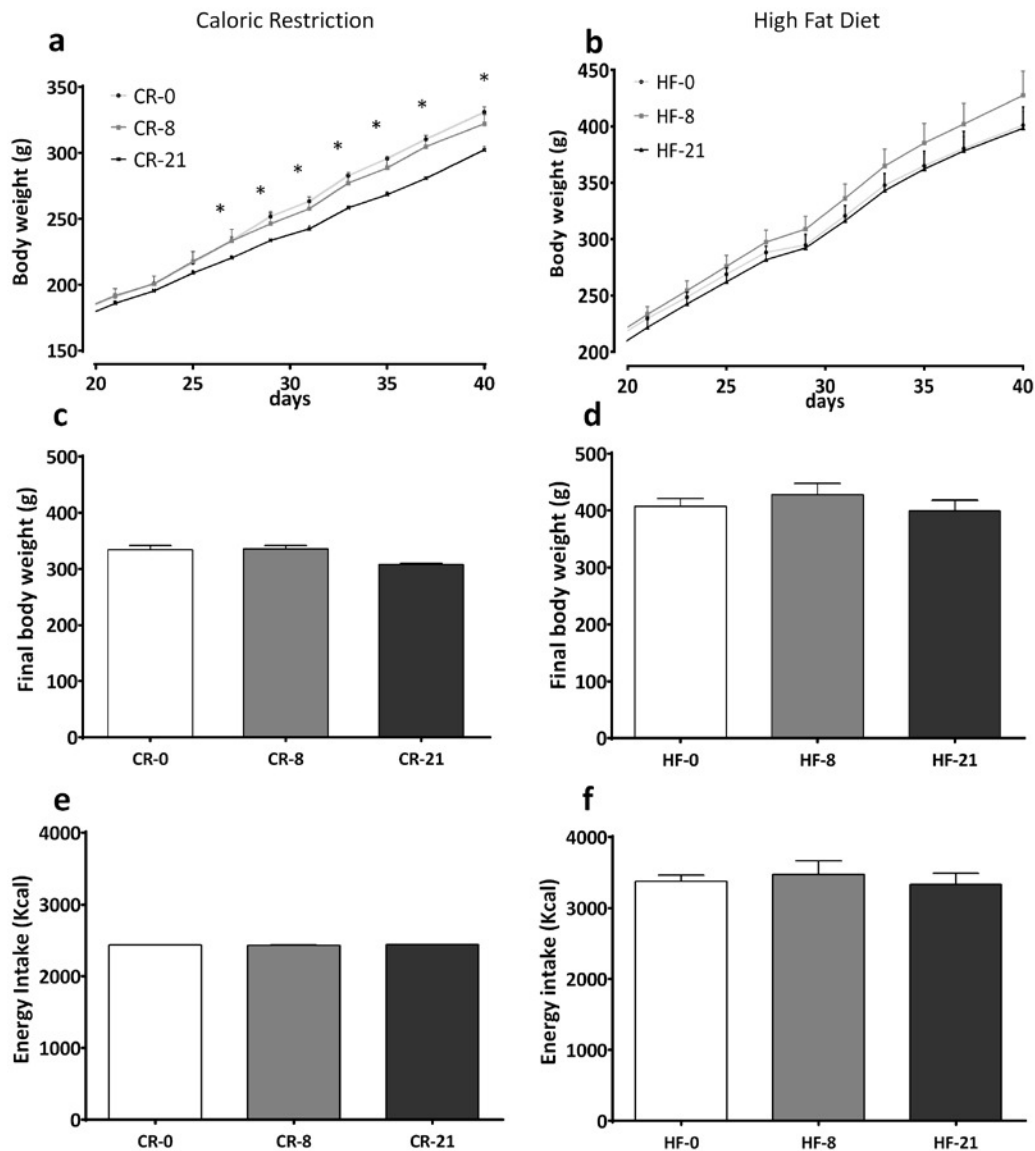
The stomach mRNA level of preproghrelin (PPG) gene was measured in the MF groups (Fig. 4a) showing a linear decrease when dietary C8:0 increased. The expression level of ghrelin peptide was quantified by immunochemistry in longitudinal sections of gastric mucosa for the MF groups (Figs. 4b and c) and the signal was measured in the corpus. The percent of cells expressing ghrelin in the corpus was higher in the MF-0 group (0.9% of total cell in the mucosa) than in MF-8 or MF-21 groups (0.6% and 0.7% respectively) ($P < 0.01$). The stomach mRNA level of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) gene was also measured in the MF groups (S4 Fig.) showing no significant effect of dietary C8:0 on the enzyme expression.

Analysis of parameters putatively controlled by plasma ghrelin

Body weight and dietary consumption

In the MF groups, no significant differences on body weight gain, final body weight and cumulative energy intakes were observed (Figs. 5a, b and c). In the CR-groups and HF groups (S5 Fig.) no effect of the level of C8:0 was shown on the weight gain and energy intake.

Fat mass and adiposity



S5 Figure. Effect of tricapyrlin on body weight gain and food intake in CR groups (70 % of ad libitum) and HF groups

(a) Body weight gain (in gram) in CR groups. Two-way repeated measurement ANOVA: effect of the diet, $P=0.0662$. (b) Body weight gain (in gram) in HF diets. Two-way repeated measurement ANOVA: effect of the diet, $P=0.5743$. (c) Final Body weight (in gram) after 6 weeks on CR diets. Kruskal-Wallis test (K-W): $P=0.0714$. (d) Final Body weight (g) after 6 weeks on HF diets. K-W test: $P=0.5097$ (e) Cumulative energy intake after 6 weeks of CR diets (in Kcal); SEM is equal to zero because the rats ate their whole daily food ration; (f) Cumulative energy intake after 6 weeks on HF diets (in Kcal). K-W test: $P=0.9286$ Results expressed as mean \pm SEM.

Because adipose tissues are target organs for ghrelin (Castaneda et al., 2010) and are also influenced by consumption of FAs, the impact of the diets on fat pad masses and on histological parameters of subcutaneous adipose tissues was studied. Fat pad masses were measured for several adipose tissues (mesenteric, epididymal, subcutaneous, retroperitoneal and perirenal) in rats fed with the MF, CR and HF diets and no significant differences were observed (**S6 Fig.**). In the subcutaneous adipose tissue of the MF rats, **Fig. 6** shows that rats consuming both the MF-8 and -21 diets exhibited an increased frequency of larger adipocytes compared with the control group. As a consequence, the mean adipocyte size (**Fig. 6b**) in the subcutaneous fat of rats fed with both MF-8 and MF-21 (respectively $63\pm 2\ \mu\text{m}$ and $63\pm 2\ \mu\text{m}$) was significantly larger than in rats fed with the control diet ($54\pm 1\ \mu\text{m}$) ($P<0.0001$).

Plasma parameters

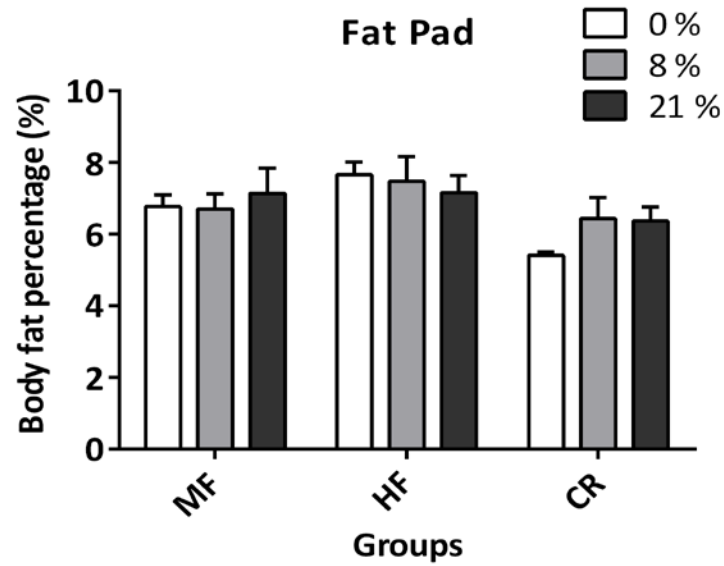
The results obtained by measuring TG, total CH and glucose in plasma collected at the sacrifice are presented in **S2 Table**. In the MF groups, no effect of increasing dietary amounts of C8:0 was shown on these plasma parameters. The CR and HF rats also displayed the same triglyceridemia and glycemia between groups receiving dietary C8:0 and control groups.

Liver IGF-1 and pituitary GHSR-1a mRNA levels

The liver mRNA level of the IGF-1 gene (**Fig. 7**) was analyzed because it is directly influenced by the GH secretion, itself regulated by the acylated ghrelin *via* its binding to GHSR-1a receptor (Chia, 2014). The expression was higher in both MF-8 and MF-21 groups than in the control group, with a significant effect between MF-21 and MF-0 rats. The analysis of the mRNA level of GHSR-1a gene in the hypothalamo-pituitary complex did not show any difference of expression between the MF rats (*data not shown*).

Discussion

The discovery of ghrelin as the endogenous ligand of GHSR-1a receptor (Kojima et al., 1999) and the description of its GOAT-catalyzed essential post-translational octanoylation (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008a) brought to light a new issue which is to understand the physiological functions regulated by dietary C8:0. The present study aimed at describing the effect of moderate to high dietary enrichment in caprylic acid on several physiological



S6 Figure. Effect of tricaprylin on body fat percentage in MF, CR and HF groups

Masses of mesenteric, epididymal, subcutaneous and retroperitoneal relate to total body weight. K-W test: MF groups, $P=0.9384$; HF groups, $P=0.6737$; CR groups, $P=0.096$.

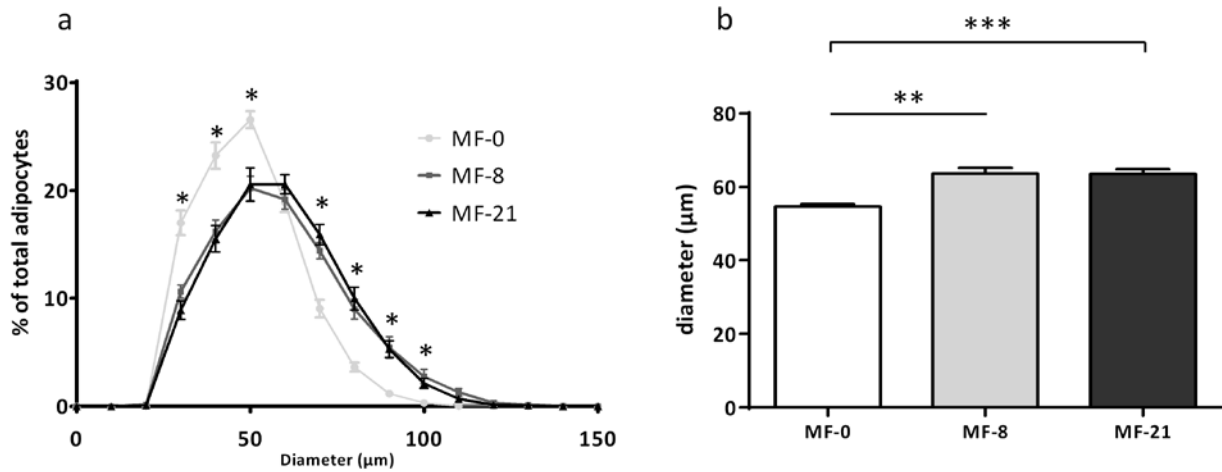


Figure 6. Effect of tricaprylin in the MF groups on adiposity

(a) Frequency distribution of adipocyte diameter (μm). (b) Adipocyte diameter (μm), K-W test, $**P<0.01$, Dunn's $***P<0.001$. Results are expressed as mean \pm SEM.

parameters which may be either directly regulated by C8:0, since MCFAs have specific metabolic properties, or indirectly by its ability to acylate ghrelin. The animals received three dietary caprylic acid levels (0, 8 and 21% of FAs) in three different nutritional conditions (moderate fat, caloric restriction and high fat). The rationale for such an experimental design was to exacerbate the potential effects of dietary caprylic acid in different nutritional conditions. Indeed, it has been shown in Goat^(-/-) mice that the GOAT-ghrelin axis helped to regulate glucose homeostasis in case of prolonged calorie restriction (Sun et al., 2006; Zhao et al., 2010). In addition, it is known that the nutritional conditions influence the concentrations of acylated and unacylated ghrelin (Kirchner et al., 2009; Leidy et al., 2007). Except the substitution with decreasing levels of the long chain saturated C16:0, the diet FA compositions were set to values achievable in human nutrition when expressed as % energy (Legrand et al., 2011).

We first investigated the effect of the three dietary caprylic acid levels on the stomach C8:0 availability to further correlate them with the plasma acylated ghrelin concentrations. C8:0 was not detected in the liver or in the plasma (**Table 3**) after an 18h fast, confirming that it had been rapidly taken up and catabolized by the liver (Zammit, 1984), even in rats fed during 6 weeks with high amounts of caprylic acid. Additionally, only a very low storage of this FA was shown in different adipose tissues even with the higher C8:0 dietary level (Table 3), which is also consistent with the described portal vein transport of MCFAs as free fatty acids (You et al., 2008). Finally, dietary C8:0 increased the C8:0 level in the stomach tissue more than in all other tissues (**Table 3**). Moreover, the C8:0 amount was 2- to 3-fold higher in the fundus than in the corpus of both MF-8 and -21 groups (**Fig. 1**). These results are therefore consistent with an early preduodenal hydrolysis of tricaprylin and direct absorption of C8:0 at the gastric level, starting in the first part of the stomach. The digestion of dietary fat is a complex and dynamic process which starts in the upper gastrointestinal tract under the action of preduodenal lipase (gastric lipase in humans or its homologous lingual lipase in rats) and is completed in the small intestine by pancreatic lipase. Although the existence and functional importance of a preduodenal lipase was disputed in the past (Clark et al., 1969), it is now described as contributing to 15-20 % of the whole lipolysis process (Carrière et al., 1993). This preduodenal lipase may play two important roles in triggering the action of

S2 Table. Effect of tricaprylin on triglyceridemia, cholesterolemia and glycemia in MF, CR and HF groups

	Triglycerides (g/l)	Total-cholesterol (g/l)	Glucose (g/l)
MF-0	1,44 ± 0,13	0,93 ± 0,09	1,81 ± 0,09
MF-8	1,39 ± 0,19	1,01 ± 0,13	1,92 ± 0,07
MF-21	1,58 ± 0,12	1,21 ± 0,14	1,94 ± 0,03
CR-0	2,74 ± 0,49	1,25 ± 0,13	1,96 ± 0,13
CR-8	2,65 ± 0,43	1,51 ± 0,06	1,74 ± 0,11
CR-21	1,70 ± 0,18	1,43 ± 0,06	1,72 ± 0,08
HF-0	1,54 ± 0,29	0,86 ± 0,07	1,82 ± 0,07
HF-8	1,40 ± 0,21	0,81 ± 0,05	1,93 ± 0,12
HF-21	1,33 ± 0,15	0,86 ± 0,08	1,70 ± 0,07

Results expressed as mean ± SEM

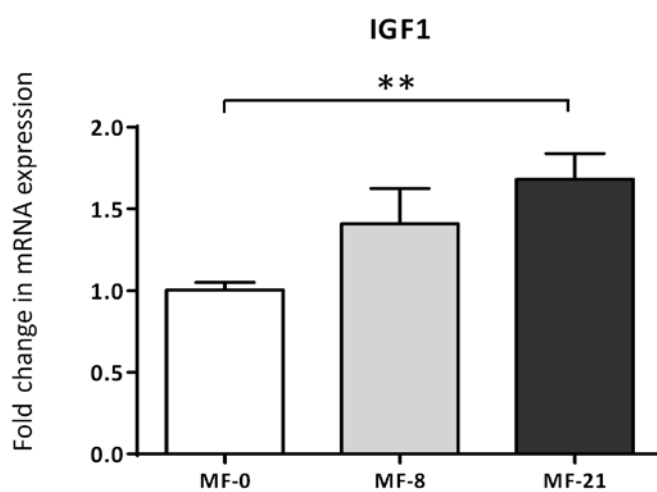


Figure 7. Effect of C8:0 in the MF groups on liver IGF-1 expression

IGF-1 mRNA level (in fold change). K-W test, P=0.009, Dunn's post tests, *P<0.05. Results are expressed as mean ± SEM.

pancreatic lipase (Gargouri et al., 1986a) and driving the early release of short and medium chain FAs that can therefore be directly absorbed in the stomach (Perret, 1980), which is consistent with our results (**Table 3**). The amounts of MCFAs absorbed by the gastric mucosa, the mechanism of this absorption (Egelrud et al., 1971) and the metabolic fate of C8:0 which could be used to acylate proghrelin are still unknown. Since the maximum C8:0 stomach content of the rats fed with the highest enriched diet only reached 1.2% of the total FAs (**Table 3**), our results suggested either that this absorption was limited or that the absorbed gastric caprylic acid was rapidly catabolized. Interestingly, in the control group receiving no C8:0, a very low but detectable amount of C8:0 (0.07% of FAs) was found in the stomach (**Table 3**). This suggests a possible endogenous synthesis which has been described for instance in rat liver for C14:0 (Rioux et al., 2007), but not yet for C8:0. Thus, the present work demonstrates that dietary C8:0 provided the stomach cells (especially the fundus cells) with caprylic acid.

The next issue was to determine if this higher available stomach C8:0 level influenced the stomach total ghrelin expression and increased the concentration of circulating acylated ghrelin, after the action of the gastric GOAT enzyme. Indeed, Nishi et al. detected heptanoylghrelin (Nishi et al., 2005a) or decanoylghrelin (Nishi et al., 2013) in the stomachs of mice fed with triheptanoin or tricaprin. This suggests that ingested MCFAs were directly utilized for the ghrelin acylation. In ruminants, the ingestion of MCFAs during 2 weeks by lactating dairy cows also increased plasma acylated ghrelin concentrations (Fukumori et al., 2013). In the present study, the stomach preproghrelin mRNA levels (**Fig. 4a**) and the total ghrelin peptide (acylated and unacylated forms) expression, quantified by immunohistochemistry in the stomach (**Fig. 4b and 4c**), displayed a linear decrease when dietary C8:0 increased. The plasma acylated ghrelin concentration was stable regardless the dietary C8:0 levels in fed (**Fig. 2a and b**) and fasted (**Fig. 3a and b**) MF rats. A similar stability was shown in fed (**S1a and b Fig.**) and fasted (**S3a and b Fig.**) HF rats. In contrast, a reproducible significant decrease in the plasma unacylated ghrelin concentration was shown in fed (**Fig. 2a and b**) and fasted (**Fig. 3a and b**) MF rats with the increase in dietary C8:0. This decrease was also shown in fed HF rats (**S1a and b Fig.**), but not in fed CR rats (**S2a and b Fig.**) which may be explained by the rapid food consumption of some of the CR

animals (fed at 2 p.m. the day before blood collection) that made the nutritional status (fed or fasted) of the animals more random.

The decrease in unacylated ghrelin led to a reproducible increase in the acylated/total ghrelin ratio in fed and fasted MF rats (**Fig. 2c and d**) and in fasted HF rats (**S3c and d Fig.**). A similar although not significant increase was shown in fed HF rats (**S1c and d Fig.**). As shown by these ratios, acylated ghrelin accounted for 30-60% of the total circulating ghrelin with the highest ratios in the plasma of rats fed with 21% C8:0. Although circulating acylated ghrelin was generally described as 10% of the total ghrelin in humans (Patterson et al., 2005), acylated ghrelin concentration has been experimentally underestimated due to its quick degradation (Delhanty et al., 2015). It seems that acylated ghrelin could actually represent around 30 to 50% of the total ghrelin in humans and in rodents (Nishi et al., 2005a), which would be consistent with our results.

These results may appear to be different from those obtained from previous studies showing that the ingestion by mice of free MCFAs or MCTs increased the stomach acylated ghrelin whereas the total amount of ghrelin remained unchanged (Nishi et al., 2005a). However, there are still conflicting results regarding the effects of dietary lipids on ghrelin response. Initially, it was proposed that a fat-rich diet decreases plasma total ghrelin levels (Lee et al., 2002), but more recently it has been established that the suppression of ghrelin by lipids is relatively weak (Cummings et al., 2005). The maturation and secretion of stomach ghrelin is indeed a complex process regulated by different parameters such as dietary LCFAs and MCFAs and by fat sensing receptor (G protein-coupled receptor 120, free fatty acid receptor 1) (Gong et al., 2014). The circulating ghrelin is additionally submitted to clearance and rapid de-acylation or degradation. For instance, a ghrelin deacylation enzyme (acyl-protein thioesterase-1, APT1) has recently been described, that can des-acylate ghrelin in the plasma (Chen et al., 2014). Moreover, acylated ghrelin has been shown to form a complex with larger proteins like immunoglobulins (Ghrelin-reactive IgG) (Takagi et al., 2013) that protects the acylated form from degradation. Some studies assaying total ghrelin in plasma have also reported lower levels in obese subjects, due to lower levels of unacylated ghrelin, whereas acylated ghrelin remained stable, suggesting a specific decreased degradation of acylated ghrelin in obese (Takagi et al., 2013). In humans, it has also been shown that the

GOAT enzyme was present in the blood, which could modify the balance between deacylation and re-acylation (Goebel-Stengel et al., 2013). In a study on the role of the gustatory G-protein in the sensing of FAs for the octanoylation of ghrelin, ingested MCFAs increased stomach acylated ghrelin but did not change the plasma ghrelin concentration (Janssen et al., 2012). For all these reasons, the concentration of both the acylated and unacylated plasma ghrelin may not simply reflect the stomach concentration (Nishi et al., 2005b). In the present study, we observed decreased unacylated ghrelin and stable acylated ghrelin concentrations in the plasma and decreased total ghrelin in the stomach, with tricaprylin consumption. We can therefore speculate that the secretion of ghrelin from the stomach to the plasma remained unchanged with tricaprylin consumption. The stable levels of stomach GOAT mRNA (**S4 Fig.**) in the MF animals also suggest that C8:0 had no effect on ghrelin octanoylation but the activity of the enzyme was not assessed. Interestingly, high levels of acylated ghrelin were measured in the MF-0 rats receiving no dietary C8:0. Thus, the low stomach C8:0 level observed in the MF-0 group (**Table 3**) could be enough to supply the octanoyl-CoA co-substrate used to acylate the proghrelin. Some studies suggested that the availability of MCFAs are rate-limiting for the acylation and activation of ghrelin (Nishi et al., 2012) but our results showed stable concentrations of plasma acylated ghrelin whatever the dietary C8:0 levels and decreasing concentrations of its corresponding unacylated form.

These results raised the question of the physiological impact of the increased acylated/total ghrelin ratio resulting from stable plasma acylated ghrelin and decreased unacylated ghrelin. The acylated ghrelin is best known for its orexigenic actions in the central nervous system, involved in the regulation of food intake and thereby in weight control (Kamegai et al., 2001). In the present study, we did not observe any effect of dietary C8:0 on body weight gain and food intake levels in the MF groups (**Fig. 5**). The rats fed with the HF diets (**S5.b, d and f Fig.**) displayed the same weight gain, final body weight and cumulative energy intake than rats fed with the MF diets. Even fed ad libitum with the high fat diets, these rats have controlled their food intake at a similar level than the MF rats. This may explain why the plasma ghrelin level in HF groups was unchanged compared with MF groups. In the CR groups (**S4.a, c and e Fig.**), the same weight gain and final body weight were observed, but with a trend to decreased final body weight with MF-21 diet consumption. These results are

consistent with the stable concentrations of plasma acylated ghrelin and suggest the absence of physiological effects of the increased acylated/total ghrelin ratios. Indeed an intracerebral acylated ghrelin administration increased body weight by stimulating food intake and by inhibiting energy expenditure and fat catabolism (Tschöp et al., 2000). However, ghrelin-null mice did not exhibit altered food intake nor altered expression of hypothalamic neuropeptides involved in the regulation of appetite. This explains why the essentiality of endogenous ghrelin in the regulation of food intake now appears controversial (Albarran-Zeckler et al., 2011). In addition, when related to dietary lipids and especially dietary MCFAs, the importance of the so-called GOAT-ghrelin-GHSR-1a axis on these parameters is unclear. Nishi et al (Nishi et al., 2013) found no effect on body weight and food intake after feeding mice during two weeks with diets enriched in tricaprylin or tricaprins compared to control diets. However, feeding GOAT-null mice with MCT-enriched diets during 8 weeks resulted in significantly lower body weight compared with control mice (Kirchner et al., 2009). By contrast, the use of MCT-enriched diets in the limitation of adiposity has been somewhat successful in humans (Nagao et al., 2010; St-Onge et al., 2002, 2008; Tsuji et al., 2001) and in rats, when substituted for LCFAs in excess (Baba et al., 1987; Crozier et al., 1987; Geliebter et al., 1983). A systematic review of the literature concluded that MCTs had effectively a short-term reducing effect on weight gain in rats but that this effect disappeared in the long term studies (Ferreira et al., 2014), probably due to metabolic adaptation to this diet. In the present study, because dietary C8:0 was shown to be rapidly catabolized, the energy expenditure may have been increased. This may in turn have had an additional inverse effect on ghrelin which is a key component of the regulation of energy balance.

No effects of the dietary C8:0 levels and increasing acylated/total ghrelin ratios were neither shown on the plasma glucose and circulating lipids (**S1 Table**) in the MF, HF or CR groups. Acylated ghrelin was previously described as a modulator of glucose homeostasis (Briggs et al., 2011), but the implication of the GOAT-ghrelin system was recently shown to be unessential for the maintenance of euglycemia during a prolonged calorie restriction (Yi et al., 2012).

Finally, since little or no effects of the increased acylated/total ghrelin ratio or decreased unacylated ghrelin were shown on the previously described physiological parameters, we

wondered if other parameters involved in the ghrelin-GOAT system regulation could be modulated. Since the acylated ghrelin has a major role to facilitate GH secretion (Zhang et al., 2015), we therefore measured the liver insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA levels (Fig. 7) in order to obtain an assessment of the average amount of GH being produced. The expression of IGF-1 was significantly higher in the MF-21 rats than in the control group. Because plasma acyl ghrelin was constant in our study, we could hypothesize that the increased ratio of acylated/total ghrelin may have led to the activation of IGF-1 transcription via the GH releasing activity of GHSR-1a. Several studies have shown that unacylated ghrelin may act as a competitive inhibitor of acylated ghrelin for the GHSR-1a receptor (Inhoff et al., 2008; Kumar et al., 2010). Therefore, the decrease in plasma unacylated ghrelin may increase the binding of stable acylated ghrelin to its receptor.

In addition, the animals consuming tricaprylin displayed an increase in the mean diameter of adipocytes in subcutaneous adipose tissue with no increase in the fat mass (Fig. 6). This result can be explained either by a lower differentiation of preadipocytes into adipocytes leading to hypoplasia and/or by a hypertrophy of adipocytes. The link between MCFAs and adiposity is unclear since they decreased lipid accumulation in mouse 3T3-L1 preadipocytes (Han et al., 2002) but not in human adipocytes (Sarda et al., 1987). In the present study, it seems difficult to relate the increase in adipocyte diameter given the low presence of C8:0 in adipose tissue. Concerning now the effects of acylated and/or unacylated ghrelin on adipogenesis, bibliographic data are also conflicting (Bays et al., 2008). The action of ghrelin on adipogenesis may first be independent on its binding with the Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a (GHSR-1a), as demonstrated in several studies (Thompson et al., 2004; Toshinai et al., 2006), and we can hypothesize in the present study that the decrease in plasma total ghrelin with tricaprylin consumption led to a decreased differentiation of preadipocytes or increased hypertrophy of adipocytes. The action of ghrelin on adipogenesis could secondly be dependent on the GHSR-1a, and we can then hypothesize that the increased plasma acylated/total ghrelin ratio with C8:0 consumption decreased the differentiation of adipocytes.

To conclude, daily feeding with dietary C8:0 increased the C8:0 level in the stomach cells more than all the other tissues and affected the plasma acylated/total ghrelin ratio by

decreasing the concentration of unacylated ghrelin. This increased ratio was however not associated with increased body weight or dysregulation of food consumption, which were previously associated with the ghrelin-GOAT-GHSR-1a axis. In western countries, total dietary MCFAs represent less than 2% of total dietary energy including 1 to 2% of caprylic acid in milk fat. In terms of dietary recommendations, these results do not give any argument to limit the current consumption of foods containing caprylic acid (Astrup et al., 2011). Further studies are however needed to clarify the dose effect of caprylic acid on adipocyte differentiation.

Acknowledgments

The authors thank N. Boulier-Monthéan and Dr. D. Catheline for their technical assistance, F. Boissel for animal cares and lipid extractions, X. Blanc (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France) for the preparation of the diets, Dr. C. Bourlieu for the analysis of plasma free fatty acids and Dr. A. Fautrel (H2P2, Fédération de Recherche, Biosit, University of Rennes 1) for the morphometric analysis and the immunohistochemistry.

Tableau 4. Compositions des milieux réactionnels (témoin et essai) permettant la mesure de l'activité de l'enzyme malique

<i>Volumes (mL)</i>	Témoin	Essai
H ₂ O distillée	2,10	2,05
Tampon pH7.4 (triéthanolamine 0.4M)	0,5	0,5
MnCl ₂ (0.12M)	0,1	0,1
NADP (3.4mM)	0,2	0,2
L-malate (0.03M)	-	0,05
Fraction cytosolique	0,1	0,1
Volume total	3	3

A.2. Résultats complémentaires

L'article 1 décrit et discute les effets de la dose de C8:0 alimentaire sur l'absorption gastrique et l'acylation de la ghréline. D'autres résultats complémentaires ont été obtenus au cours de cette expérimentation sur : la composition en acides gras dans différents tissus, le métabolisme hépatique des lipides, l'adiposité dans le tissu adipeux mésentérique. Ces résultats sont décrits et disputés dans la partie suivante.

A.2.1. Matériels et méthodes

A.2.1.1. Extraction des lipides et analyse de la composition en acides gras des tissus

La méthodologie d'analyse des acides gras a été présentée dans l'article 1 ('Lipid extraction and FA analysis'). Les compositions en acides gras du cerveau, du cœur, du muscle gastrocnémien, du foie et des tissus adipeux ont été calculées par rapport aux étalons internes (C9:0 et C17:0) et sont exprimées en mg/g d'organe.

A.2.1.2. Dosage pondéral des lipides du foie

500 mg de foie ont été découpés en fragments et broyés dans 20 volumes de méthylal-méthanol (4:1, v/v) puis filtrés sur pipette cotonnée, en utilisant le mélange d'extraction comme solvant de rinçage. Les tubes utilisés pour récupérer les filtrats ont été préalablement pesés avec une balance de précision (0,0001 g). Le solvant a été ensuite entièrement évaporé et les tubes contenant les lipides totaux (LT) placés dans un dessiccateur sous vide pendant 48 h puis pesés précisément. La différence de masse entre les deux pesées a permis de déduire la masse de lipides totaux en mg/g de foie.

A.2.1.3. Activité de l'enzyme malique du foie

A.2.1.3.1. Préparation des fractions cytosoliques de foie

Les échantillons de foie ont été pesés et broyés dans 10 volumes de tampon saccharose (KH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄, 2 H₂O 40 mM, pH 7,4 avec saccharose 0,25 M) à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce. Les homogénats ont été centrifugés (30 min, 10.000 g) afin d'éliminer les culots contenant les débris tissulaires, les cellules intactes, les noyaux, les mitochondries, les peroxysomes et les lysosomes. Les surnageants de cette 1^{ère} centrifugation ont ensuite été ultra-centrifugés (1 h, 100.000 g) pour culoter les microsomes. Les surnageants

Tableau 5. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur la composition en acides gras du cerveau, dans les groupes MF, HF et CR

AG (mg/g cerveau)	Régimes MF			K-W test	
	0%	8%	21%		
C14:0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	
C16:0	6.8 ± 1.5	6.7 ± 0.6	7.0 ± 1.4	-	
C18:0	5.1 ± 0.6	4.9 ± 1.0	4.7 ± 0.4	-	
Σ Saturés	11.9 ± 1.2	11.5 ± 0.9	11.7 ± 1.1	-	
C 16:1 n-9	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C 16:1 n-7	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	-	
C18:1 n-9	6.6 ± 1.0	5.7 ± 0.7	5.7 ± 1.0	-	
C18:1 n-7	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.2	1.4 ± 0.3	-	
Σ Mono-insaturés	9.6 ± 1.9	7.8 ± 1.1	7.9 ± 1.7	-	
C18:2 n-6	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	*	↘
C20:3 n-6	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	-	
C20:4 n-6	3.4 ± 1.3	3.4 ± 0.4	3.3 ± 1.0	-	
C22:4 n-6	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.1	-	
C 22:6 n-3	4.9 ± 0.9	5.0 ± 1.1	4.9 ± 1.5	-	
Σ Poly-insaturés	9.3 ± 1.8	9.2 ± 1.2	9.0 ± 2.3	-	

AG (mg/g cerveau)	Régimes HF			K-W test	
	0%	8%	21%		
C14:0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	
C16:0	5.7 ± 0.6	5.4 ± 0.4	5.0 ± 0.3	*	↘
C18:0	5.3 ± 0.2	5.1 ± 0.4	5.2 ± 0.4	-	
Σ Saturés	11.1 ± 0.5	10.6 ± 0.7	10.2 ± 0.5	*	↘
C 16:1 n-9	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C 16:1 n-7	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C18:1 n-9	5.2 ± 1.0	4.4 ± 0.7	4.4 ± 0.7	-	
C18:1 n-7	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.3	-	
Σ Mono-insaturés	7.3 ± 1.9	6.3 ± 1.2	6.7 ± 1.6	-	
C18:2 n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	-	
C20:3 n-6	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	-	
C20:4 n-6	2.8 ± 0.5	2.6 ± 0.5	2.5 ± 0.3	-	
C22:5 n-3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C 22:6 n-3	3.9 ± 0.4	4.0 ± 0.7	3.5 ± 0.3	-	
Σ Poly-insaturés	7.1 ± 0.8	7.1 ± 0.9	6.5 ± 0.4	-	

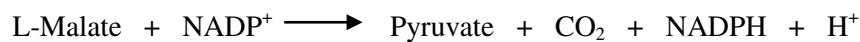
AG (mg/g cerveau)	Régimes CR			K-W test	
	0%	8%	21%		
C14:0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	
C16:0	4.8 ± 0.2	4.7 ± 0.5	5.7 ± 0.8	-	
C18:0	4.8 ± 0.1	4.6 ± 0.3	5.4 ± 0.6	-	
Σ Saturés	9.6 ± 0.2	9.4 ± 0.8	11.1 ± 1.4	-	
C 16:1 n-9	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C 16:1 n-7	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C18:1 n-9	4.8 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.6 ± 0.4	-	
C18:1 n-7	1.3 ± 0.0	1.1 ± 0.2	1.2 ± 0.2	-	
Σ Mono-insaturés	7.4 ± 0.5	6.3 ± 1.0	6.6 ± 0.9	-	
C18:2 n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	-	
C20:3 n-6	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C20:4 n-6	2.1 ± 0.1	2.1 ± 0.4	2.5 ± 0.5	-	
C22:5 n-3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	
C 22:6 n-3	3.9 ± 0.3	3.4 ± 0.3	3.6 ± 0.6	-	
Σ Poly-insaturés	6.5 ± 0.2	6.0 ± 0.3	6.6 ± 0.9	-	

Les valeurs sont exprimées en mg d'acide gras/g de cerveau ± Écart-type

de l'ultracentrifugation (fractions cytosoliques), contenant l'enzyme malique, ont été récupérés pour la mesure d'activité. Les concentrations en protéines dans les fractions cytosoliques ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

A.2.1.3.2. Mesure de l'activité de l'enzyme malique

L'enzyme malique catalyse la réaction suivante :



L'activité est déterminée par la méthode de Hsu et Lardy (1969), basée sur la mesure de l'apparition du NADPH par spectrophotométrie (à 340 nm). Le **Tableau 4** présente la composition des milieux réactionnels du témoin et de l'essai. L'absorbance est mesurée (à 37 °C), en fonction du temps, dès que tous les réactifs sont présents dans le milieu réactionnel. L'activité spécifique (AS) de l'enzyme correspondant à la quantité de NADPH formé (en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de protéine) est ainsi calculée :

$$AS = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon \times l} \times \frac{V}{\text{masse prot}}$$

Où $\Delta A/\Delta t$ est la pente de la tangente à l'origine de la cinétique $A_{340} = f(t)$ (en min^{-1}), ε le coefficient d'absorption du NADPH ($\varepsilon = 6,2 \text{ mL}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), l la longueur de la cuve (1 cm), V le volume total du milieu d'incubation (en mL), $\text{masse}_{\text{prot}}$ la masse de protéines dans les 100 μL de fraction cytosolique (en g).

A.2.1.4. Mesure des transcrits (ARNm) par PCR quantitative en temps réel (RT-PCRq)

La méthodologie de mesure des ARN messagers d'un gène cible par RT-PCRq a été présentée dans l'article 1 ('Quantification of mRNA expression by Real-Time PCR'). La mesure des ARNm a été réalisée pour IL-6, TNF- α ,

A.2.1.4. Mesure de l'adiposité dans le tissu adipeux méésentérique

La méthodologie de mesure de l'adiposité a été présentée pour un autre tissu adipeux (sous-cutané) dans l'article 1 ('Determination of adipocyte size (morphometric analysis)').

Tableau 6. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur la composition en acides gras du cœur, dans les groupes MF, HF et CR

AG (mg/g cœur)	Régimes MF			K-W test	
	0%	8%	21%		
C16:0	2.7 ± 0.4	2.7 ± 0.4	2.9 ± 0.3	-	
C18:0	4.0 ± 0.7	3.6 ± 0.1	4.0 ± 0.3	-	
Σ Saturés	6.6 ± 1.1	6.3 ± 0.5	6.9 ± 0.6	-	
C18:1 n-9	1.8 ± 0.7	1.7 ± 0.8	1.7 ± 0.2	-	
C18:1 n-7	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	-	
Σ Mono-insaturés	2.5 ± 0.7	2.4 ± 0.9	2.4 ± 0.3	-	
C18:2 n-6	2.7 ± 0.8	2.5 ± 0.3	2.8 ± 0.4	-	
C20:4 n-6	3.8 ± 0.7	3.3 ± 0.3	3.5 ± 0.2	-	
C22:5 n-3	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	-	
C 22:6 n-3	2.1 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.3	-	
Σ Poly-insaturés	8.9 ± 1.8	7.7 ± 0.5	8.2 ± 0.2	-	

AG (mg/g cœur)	Régimes HF			K-W test	
	0%	8%	21%		
C16:0	3.1 ± 0.4	2.9 ± 0.3	2.5 ± 0.3	*	↘
C18:0	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.2	-	
Σ Saturés	7.4 ± 0.6	7.3 ± 0.6	6.7 ± 0.4	*	↘
C18:1 n-9	1.9 ± 0.7	1.8 ± 0.3	1.9 ± 0.7	-	
C18:1 n-7	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	-	
Σ Mono-insaturés	2.5 ± 0.7	2.3 ± 0.4	2.4 ± 0.7	-	
C18:2 n-6	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.4	-	
C20:4 n-6	3.6 ± 0.3	3.5 ± 0.4	3.4 ± 0.1	-	
C22:5 n-3	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	-	
C 22:6 n-3	2.1 ± 0.4	2.0 ± 0.4	2.0 ± 0.2	-	
Σ Poly-insaturés	8.4 ± 0.5	8.3 ± 0.7	8.0 ± 0.4	-	

AG (mg/g cœur)	Régimes CR			K-W test	
	0%	8%	21%		
C16:0	2.9 ± 0.2	2.8 ± 0.2	2.8 ± 0.3	-	
C18:0	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.2	3.8 ± 0.4	-	
Σ Saturés	6.7 ± 0.2	6.8 ± 0.3	6.5 ± 0.7	-	
C18:1 n-9	1.8 ± 0.2	2.0 ± 0.7	2.1 ± 0.1	-	
C18:1 n-7	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.0	-	
Σ Mono-insaturés	2.4 ± 0.3	2.7 ± 0.8	2.9 ± 0.1	-	
C18:2 n-6	3.6 ± 0.5	3.5 ± 0.3	4.0 ± 0.6	-	
C20:4 n-6	3.1 ± 0.0	3.5 ± 0.2	2.8 ± 0.4	-	
C22:5 n-3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C 22:6 n-3	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.4	-	
Σ Poly-insaturés	7.9 ± 0.3	8.4 ± 0.3	7.9 ± 0.3	-	

Les valeurs sont exprimées en mg d'acide gras/g de cœur ± Écart-type

A.2.1.5. Analyses statistiques

Les valeurs sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type à la moyenne pour les tableaux de composition en acides gras et sous forme de moyenne \pm erreur standard pour les autres analyses.

A.2.3. Résultats

A.2.3.1. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en AG du cerveau, du cœur et du muscle gastrocnémien

- Effets de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en AG du cerveau

La dose de Tri-C8:0 (trioctanoïne) consommée n'a pas d'effet sur le poids des cerveaux dans les groupes MF, HF et CR (*données non incluses*). La quantité de C8:0 dans le cerveau est en dessous de la limite de détection, quelle que soit la dose de Tri-C8:0 ingérée (**Tableau 5**). Il n'y a pas d'effet des régimes sur les AGS (C16:0 et C18:0) dans les groupes MF et CR. Concernant les rats ayant consommé les régimes hyperlipidiques, la masse d'AGS est significativement plus faible dans les groupes HF-8 et 21 ($10,6 \pm 0,7$ et $10,2 \pm 0,5$ mg/g de cerveau) par rapport au contrôle HF-0 ($11,1 \pm 0,5$ mg/g) (* $P < 0,05$). Dans les groupes MF, HF et CR, il n'y a pas d'effet de la dose de Tri-C8:0 sur les masses d'AGMI et PI, si ce n'est une légère baisse de la masse d'acide linoléique (LA) dans les groupes MF-8 et MF-21, comparés au contrôle MF-0.

- Effets de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en AG du cœur

La dose de Tri-C8:0 n'a pas d'effet sur la masse du cœur dans les groupes MF, HF et CR (*données non incluses*). Le C8:0 n'est pas détecté dans le tissu cardiaque des groupes MF, HF et CR (**Tableau 6**). Dans les groupes MF et CR, la dose de Tri-C8:0 alimentaire ne modifie pas la masse des AGS. En revanche, dans le groupe HF-21, la masse de C16:0 ($6,7 \pm 0,4$ mg/g de cœur) est significativement plus faible que dans le groupe contrôle ($7,4 \pm 0,6$ mg/g pour HF-0), à l'instar de ce qui est observé dans le cerveau (* $P < 0,05$). Les masses d'AGMI et PI ne sont pas significativement modifiées par la dose de Tri-C8:0 ingérée.

Tableau 7. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur la composition en acides gras du muscle gastrocnémien, dans les groupes MF, HF et CR

AG (mg/g muscle)	Régimes MF			K-W test	
	0%	8%	21%		
C16:0	2.3 ± 0.5	2.0 ± 0.3	2.2 ± 0.4	-	
C18:0	1.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1	1.3 ± 0.3	-	
Σ Saturés	3.6 ± 0.8	3.1 ± 0.3	3.5 ± 0.6	-	
C 16:1 n-7	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.2	-	
C18:1 n-9	1.6 ± 0.5	1.4 ± 0.4	1.8 ± 0.7	-	
C18:1 n-7	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1	-	
Σ Mono-insaturés	2.1 ± 0.6	1.9 ± 0.4	2.4 ± 0.9	-	
C18:2 n-6	1.4 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.3	-	
C20:4 n-6	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.2	-	
C22:5 n-3	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	**	↘
C 22:6 n-3	1.8 ± 1.5	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.4	-	
Σ Poly-insaturés	4.6 ± 2.0	3.2 ± 0.3	3.4 ± 0.9	-	

AG (mg/g muscle)	Régimes HF			K-W test	
	0%	8%	21%		
C16:0	2.7 ± 0.4	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.3	*	↘
C18:0	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	-	
Σ Saturés	3.9 ± 0.4	2.8 ± 1.4	2.6 ± 1.3	**	↘
C 16:1 n-7	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C18:1 n-9	2.6 ± 0.8	2.0 ± 0.4	2.6 ± 1.0	-	
C18:1 n-7	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	-	
Σ Mono-insaturés	3.0 ± 0.9	2.0 ± 1.1	2.5 ± 1.6	-	
C18:2 n-6	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.2	-	
C20:4 n-6	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.2	-	
C22:5 n-3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C 22:6 n-3	0.9 ± 0.3	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.3	-	
Σ Poly-insaturés	3.5 ± 0.6	3.2 ± 1.6	2.8 ± 1.4	-	

AG (mg/g muscle)	Régimes CR			K-W test	
	0%	8%	21%		
C16:0	1.8 ± 0.6	2.5 ± 0.4	2.6 ± 0.8	-	
C18:0	1.0 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.1	-	
Σ Saturés	2.8 ± 0.9	3.8 ± 0.6	4.1 ± 0.7	-	
C 16:1 n-7	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.3	-	
C18:1 n-9	1.1 ± 0.1	2.1 ± 0.7	2.2 ± 1.2	-	
C18:1 n-7	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	-	
Σ Mono-insaturés	1.5 ± 0.2	2.7 ± 0.8	2.9 ± 1.5	-	
C18:2 n-6	1.2 ± 0.4	1.7 ± 0.3	1.9 ± 0.3	-	
C20:4 n-6	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.0	-	
C22:5 n-3	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C 22:6 n-3	0.6 ± 0.3	0.8 ± 0.5	1.0 ± 0.3	-	
Σ Poly-insaturés	2.6 ± 1.1	3.8 ± 1.0	4.1 ± 0.1	-	

Les valeurs sont exprimées en mg d'acide gras/g de muscle ± Écart-type

- **Effets de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en AG du muscle gastrocnémien**

Le C8:0 n'est pas détecté dans le muscle gastrocnémien des rats des groupes MF, HF et CR. L'effet de la Tri-C8:0 alimentaire sur les masses d'AGS est neutre pour les groupes MF et CR (**Tableau 7**). Dans les muscles des rats HF-8 et 21, la masse de C16:0 est significativement plus faible que dans le groupe HF-0 (* $P < 0,05$). Les masses d'AGMI et PI dans le muscle ne sont pas significativement modifiées par la dose de Tri-C8:0 dans les groupes MF, HF et CR, excepté la masse de DPA qui diminue légèrement dans les groupes MF-8 et 21 par rapport au contrôle (** $P < 0,01$).

A.2.3.2. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur le métabolisme lipidique dans le foie

- **Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la masse des lipides totaux dans le foie**

La dose de Tri-C8:0 consommée n'a pas d'impact sur le poids du foie (*données non incluses*). En revanche, un effet est observé sur la masse des lipides totaux (LT), ce qui inclut les acides gras, les triglycérides, les phospholipides ainsi que le cholestérol (**Figure 19**). Outre l'effet du type de régime (masse des LT des groupes HF > MF > CR), la masse des LT hépatiques est plus élevée dans les groupes MF-8 et 21 (environ 80 et 90 mg/g de foie) que dans le groupe MF-0 (50 mg/g de foie). Cet effet de la Tri-C8:0 n'est pas observé dans les groupes HF. Dans les groupes des rats en restriction calorique, la masse des LT tend à croître lorsque l'apport en Tri-C8:0 est plus important, mais de manière non significative.

- **Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en AG du foie**

Il n'y a pas de C8:0 mesuré dans les foies des rats des groupes MF-0, 8 et 21 (**Tableau 8**). La masse des AGS est plus élevée lorsque l'apport en Tri-C8:0 dans le régime est plus important et que l'apport en C16:0 est plus faible ($18,3 \pm 2,4$ mg/g pour MF-0 contre $23,4 \pm 3,0$ mg/g et $26,3 \pm 5,6$ mg/g pour MF-8 et MF-21). La masse de la somme des AGMI est également significativement plus élevée dans les groupes MF-8 et 21 ($24,9 \pm 5,9$ et $32,0 \pm 8,4$ mg/g de foie), comparés au contrôle MF-0 ($18,1 \pm 3,2$ mg/g). Il en est de même pour la somme des AGPI dont la masse est égale à $10,6 \pm 1,3$ mg/g dans le groupe MF-0 contre $12,6 \pm 1,5$ et $13,4 \pm 1,1$ mg/g de foie dans les groupes MF-8 et 21.

Dans le foie des rats ayant consommé les régimes hyperlipidiques (**Tableau 9**), une quantité très faible de C8:0 est mesurée pour le groupe HF-21 ($0,1 \pm 0,0$ mg/g). Aucun effet

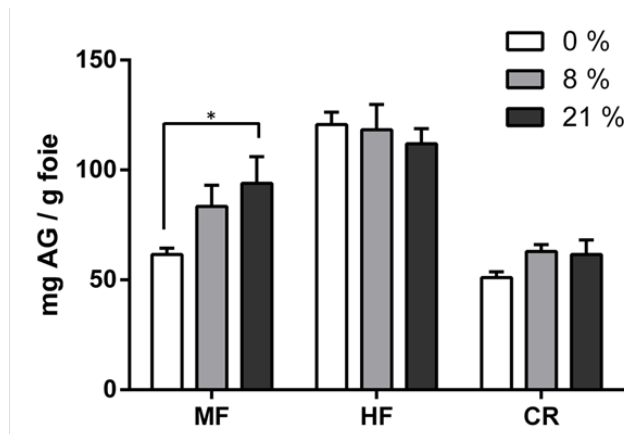


Figure 19. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur la masse des lipides totaux (LT) dans le foie des rats des groupes MF, HF et CR

Les valeurs sont exprimées en mg/g de foie \pm S.E.M. ANOVA à deux voies : interaction, $P=0,219$; Type de régime (MF, HF, CR), $P<0,0001$; Dose de trioctanoïne, $P=0,287$. Test de Kruskal-Wallis, groupes MF : $P<0,05$.

Tableau 8. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en acides gras du foie des rats ayant consommé les régimes MF

AG (mg/g foie)	Régimes MF			K-W test	
	0%	8%	21%		
C8:0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	-	
C12:0	0.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	-	
C14:0	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.2	**	↗
C16:0	12.8 \pm 2.0	17.3 \pm 3.3	19.4 \pm 5.3	*	↗
C18:0	5.2 \pm 0.8	5.8 \pm 1.1	6.3 \pm 1.0	-	
Σ Saturés	18.3 \pm 2.4	23.4 \pm 3.0	26.3 \pm 5.6	**	↗
C 16:1 n-9	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2	*	↗
C 16:1 n-7	1.8 \pm 1.0	2.2 \pm 1.0	4.0 \pm 1.6	*	↗
C18:1 n-9	14.7 \pm 2.3	20.4 \pm 4.5	24.9 \pm 5.9	**	↗
C18:1 n-7	1.4 \pm 0.2	2.1 \pm 0.5	2.8 \pm 0.8	**	↗
Σ Mono-insaturés	18.1 \pm 3.2	24.9 \pm 5.9	32.0 \pm 8.4	**	↗
C18:2 n-6	3.1 \pm 0.4	3.6 \pm 0.6	4.1 \pm 0.6	*	↗
C18:3 n-3	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	-	
C20:2 n-6	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	-	
C20:3 n-6	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	-	
C20:4 n-6	5.0 \pm 0.8	6.2 \pm 1.2	6.3 \pm 1.2	-	
C20:5 n-3	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	-	
C22:5 n-3	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	*	↗
C 22:6 n-3	2.1 \pm 0.4	2.3 \pm 0.4	2.3 \pm 0.4	-	
Σ Poly-insaturés	10.6 \pm 1.3	12.6 \pm 1.5	13.4 \pm 1.1	**	↗

Les valeurs sont exprimées en mg d'acide gras/g de foie \pm Écart-type

de l'apport en Tri-C8:0 sur les masses des autres AGS, des AGMI et des AGPI n'est observé pour les groupes HF et CR.

- **Effet de la dose de Tri-C8:0 sur les enzymes liées à la synthèse *de novo* des AG**

L'activité de l'enzyme malique et l'expression des ARNm de l'enzyme FAS ont été mesurées dans le foie (**Figure 20**). L'enzyme malique permet la réduction du cofacteur NADP⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) en NADPH, utilisé pour la synthèse d'acides gras par l'enzyme FAS. L'activité spécifique de l'enzyme malique dans le foie est significativement modifiée par le type de régime (MF, HF et CR), mais pas par la dose de Tri-C8:0 consommée. De même pour l'expression des transcrits du gène *Fasn*, codant pour l'enzyme FAS.

A.2.3.3. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur les TA épидидymal, sous-cutané et mésentérique

- **Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en AG du TA épидидymal**

Le poids du tissu adipeux épидидymal (TAE) n'est pas modifié par la dose de Tri-C8:0 ingérée (*donnée non incluses*). Le C8:0 est détecté dans les groupes MF, HF et CR ayant ingéré de la Tri-C8:0 (**Tableaux 10 et 11**). Les masses des autres AGS, des AGMI et PI ne changent pas selon la dose de Tri-C8:0, dans les groupes MF et CR. Dans le groupe HF-21, la masse de C16:0 est plus faible que dans les groupes HF-0 et 8 (*P<0,05 et **P<0,01). En revanche, les masses de C16:1 n-9, C18:1 n-9, C18:1 n-7 et C20:1 n-9 sont significativement plus élevées dans le TAE des rats HF-8 et 21 que dans le TAE des rats HF-0. La masse de la somme des AGPI est plus élevée dans les groupes HF-8 et -21, comparée au groupe témoin (**P<0,001), dû à une augmentation des masses de LA et d'ALA. On peut noter que pour les AGPI et les AGMI, les valeurs des masses sont très proches entre le groupe HF-8 et le groupe HF-21.

- **Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en AG du TA sous-cutané**

Le C8:0 est détecté dans le TA sous-cutané (TA SC) groupes MF, HF et CR ayant ingéré de la Tri-C8:0 (**Tableaux 12 et 13**). Une légère augmentation de la masse de C14:0 dans les groupes MF-8 et 21 (**P<0,01) et une forte diminution de la masse de C16:0 dans les groupes HF-8 et 21 (**P<0,001) comparé aux témoins sont mesurées. Il n'y a pas d'autres effets de l'apport en Tri-C8:0 sur la masse des AGS dans les groupes MF, HF et CR. Il n'y a pas non

Tableau 9. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en acides gras du foie des rats ayant consommé les régimes HF et CR

AG (mg/g foie)	Régimes HF			K-W test	
	0%	8%	21%		
C8:0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	**	↗
C12:0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	
C14:0	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2	-	
C16:0	21.9 ± 2.8	18.7 ± 6.0	18.3 ± 4.6	-	
C18:0	6.1 ± 0.6	5.3 ± 1.0	6.2 ± 0.6	*	
Σ Saturés	28.2 ± 3.3	24.4 ± 6.8	24.9 ± 4.7	-	
C 16:1 n-9	0.4 ± 0.3	0.7 ± 0.6	0.6 ± 0.3	-	
C 16:1 n-7	1.7 ± 0.8	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.3	-	
C18:1 n-9	35.9 ± 3.9	36.3 ± 14.6	41.4 ± 12.7	-	
C18:1 n-7	2.6 ± 1.4	2.3 ± 1.2	2.8 ± 0.6	-	
Σ Mono-insaturés	40.6 ± 4.7	40.8 ± 15.0	46.4 ± 13.4	-	
C18:2 n-6	9.5 ± 1.9	11.2 ± 5.5	10.5 ± 4.0	-	
C18:3 n-3	0.7 ± 0.4	0.9 ± 0.5	0.9 ± 0.6	-	
C20:2 n-6	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C20:3 n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.0	-	
C20:4 n-6	6.5 ± 0.6	5.7 ± 1.3	6.2 ± 0.8	-	
C20:5 n-3	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	-	
C22:5 n-3	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	-	
C 22:6 n-3	2.4 ± 0.4	2.2 ± 0.6	2.4 ± 0.2	-	
Σ Poly-insaturés	19.7 ± 3.1	20.7 ± 7.8	20.7 ± 4.3	-	

AG (mg/g foie)	Régimes CR			K-W test	
	0%	8%	21%		
C8:0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	
C12:0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	
C14:0	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	-	
C16:0	10.0 ± 3.8	9.5 ± 1.9	11.9 ± 3.1	-	
C18:0	4.7 ± 0.3	4.8 ± 1.0	5.4 ± 0.9	-	
Σ Saturés	15.0 ± 4.1	14.5 ± 2.9	17.6 ± 4.0	-	
C 16:1 n-9	0.6 ± 0.4	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	-	
C 16:1 n-7	1.9 ± 1.3	1.7 ± 0.6	2.0 ± 0.2	-	
C18:1 n-9	11.4 ± 3.8	11.9 ± 2.7	12.9 ± 5.7	-	
C18:1 n-7	1.4 ± 0.3	1.7 ± 0.2	2.1 ± 0.4	-	
Σ Mono-insaturés	15.3 ± 5.1	15.5 ± 3.4	17.2 ± 6.1	-	
C18:2 n-6	2.7 ± 0.2	2.7 ± 0.5	2.9 ± 0.2	-	
C18:3 n-3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	
C20:2 n-6	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0	-	
C20:3 n-6	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1	-	
C20:4 n-6	3.8 ± 0.6	4.6 ± 0.9	4.1 ± 0.5	-	
C20:5 n-3	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	-	
C22:5 n-3	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	-	
C 22:6 n-3	1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.1	-	
Σ Poly-insaturés	9.0 ± 1.0	9.6 ± 1.9	9.4 ± 0.5	-	

Les valeurs sont exprimées en mg d'acide gras/g de foie ± Écart-type

plus d'effet sur les AGMI, si ce n'est pour le C18:1 n-7 dont la masse est significativement plus élevée dans les groupes MF-8 et 21 en comparaison du groupe MF-0 (**P<0.01). La dose de Tri-C8:0 ne modifie pas les masses d'AGPI dans le TA SC des groupes MF, HF et CR.

- **Effet de la dose de Tri-C8:0 sur les paramètres morphométriques du TA mésentérique**

La masse du TA mésentérique (TAM) et sa composition en acides gras ne sont pas modifiées par les différents régimes (*données non incluses*). Le diamètre moyen et la distribution des adipocytes dans le TAM ont été mesurés dans les groupes MF (**Figure 21**) de la même manière que pour le TA SC dans l'article 1. Le diamètre moyen des adipocytes est significativement plus élevé chez les rats ayant consommé de la Tri-C8:0 (*P<0,05), comparé au groupe témoin MF-0.

- **Effet de la dose de Tri-C8:0 sur l'expression des ARN_m de certains gènes dans le TAM**

- Expression des ARN_m de cytokines pro-inflammatoires

L'expression des ARN_m des facteurs pro-inflammatoires IL-6 et de TNF- α dans le TAM a été mesurée dans les groupes MF (**Figure 22**). Il n'y a pas d'effet de la dose de Tri-C8:0 sur l'expression des ARN_m de ces deux cytokines (P>0,05). Il semble cependant y avoir un effet « en cloche » avec une expression plus importante des cytokines dans le groupe MF-8, comparé aux deux autres groupes.

- Expression des ARN_m de FAS

L'expression des ARN_m codant pour l'enzyme FAS a été mesurée dans le TAM des groupes MF (*données non incluses*). Il n'y a pas d'effet de la dose de Tri-C8:0 sur l'expression des ARN_m de cette enzyme (P>0,05).

A.2.4. Discussion

A.2.4.1. Effets de la dose de trioctanoïne sur la composition en AG dans le cerveau, le cœur et le muscle gastrocnémien

L'effet de la dose de Tri-C8:0 consommée chroniquement pendant 6 semaines sur la disponibilité tissulaire en C8:0 a été présenté dans l'article 1 : pour rappel, après 18 h de jeûne, cet acide gras est presque entièrement catabolisé et est seulement retrouvé dans les

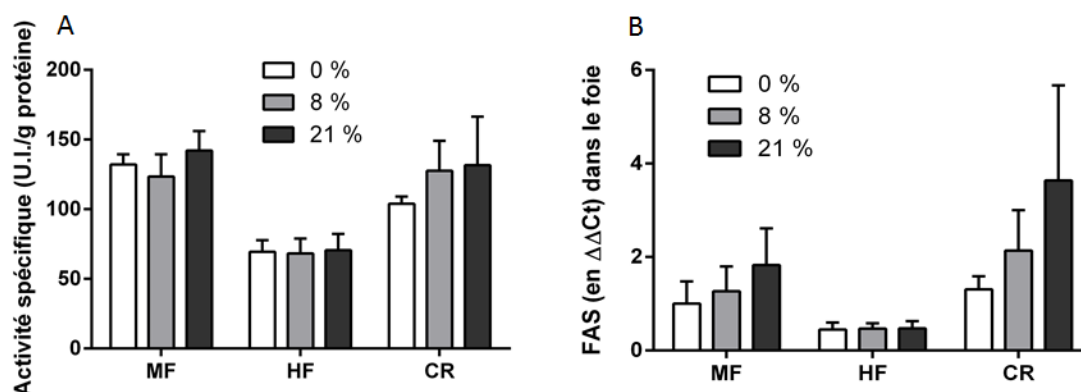


Figure 20. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur l'activité spécifique de l'enzyme malique et sur l'expression des ARN_m de l'enzyme FAS

A) Activité spécifique de l'enzyme malique dans le foie. ANOVA à deux voies : interaction, P=0,816 ; effet du type de régime, P<0,0001 ; effet de la dose de trioctanoïne, P=0,536. **B)** Expression des ARN_m de FAS dans le foie. ANOVA à deux voies : interaction, P=0,506 ; effet du type de régime, P=0,003 ; effet de la dose de trioctanoïne, P=0,109.

Tableau 10. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en acides gras du tissu adipeux épididymal des rats ayant consommé les régimes MF

AG (mg/g TAE)	Régimes MF			Test stat.	
	0%	8%	21%		
C8:0	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.3	3.2 ± 0.5	****	↗
C12:0	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	-	
C14:0	9.2 ± 1.4	9.2 ± 2.1	9.1 ± 2.2	-	
C16:0	208.9 ± 17.3	207.7 ± 33.5	169.4 ± 35.9	-	
C18:0	18.1 ± 1.7	18.9 ± 4.1	18.8 ± 3.8	-	
Σ Saturés	237.9 ± 19.6	240.6 ± 38.6	202.1 ± 41.9	-	
C 16:1 n-9	3.7 ± 0.4	3.8 ± 0.7	3.4 ± 0.6	-	
C 16:1 n-7	47.6 ± 9.0	47.2 ± 11.2	43.2 ± 11.6	-	
C18:1 n-9	375.5 ± 35.5	392.3 ± 30.4	342.4 ± 45.0	-	
C18:1 n-7	30.7 ± 5.4	31.8 ± 3.5	31.7 ± 5.3	-	
C 20:1 n-9	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.3	-	
Σ Mono-insaturés	459.5 ± 47.6	477.1 ± 44.1	423.4 ± 60.5	-	
C18:2 n-6	63.2 ± 7.6	66.7 ± 2.4	57.0 ± 6.7	-	
C18:3 n-3	10.7 ± 1.4	10.7 ± 0.6	10.0 ± 0.9	-	
C20:4 n-6	0.7 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.3	-	
Σ Poly-insaturés	74.8 ± 9.0	78.8 ± 3.3	68.0 ± 7.1	-	

Les valeurs sont exprimées en mg d'acide gras/g de tissu adipeux ± Écart-type

cellules de l'estomac et dans les tissus adipeux (TA), en faible quantité. Cependant, l'effet de l'apport en Tri-C8:0 (0, 8 ou 21% des AGT) selon le type de régime (modérément riche en lipides *ad libitum* MF, à 70% de l'*ad libitum* CR, ou hyperlipidique *ad libitum* HF) sur la disponibilité des autres acides gras dans le cerveau, le cœur et le muscle n'a pas été présenté et discuté.

Les trois mélanges lipidiques (0, 8 et 21%) utilisés pour les régimes MF et HF contiennent une quantité d'acide gras saturés (AGS) équivalente (respectivement 33,8%, 31,8% et 30,9% des AGT) ; seule la nature des AGS varie. L'augmentation de la dose de Tri-C8:0 dans le régime, compensée par une diminution de l'apport en C16:0, n'a pas d'influence sur les masses d'AGS dans le cerveau, le cœur et le muscle gastrocnémien des groupes MF et CR. L'acide octanoïque, fortement catabolisé, n'est pas mis en réserve dans ces tissus mais il semble que la synthèse *de novo* de l'acide palmitique, qui se déroule essentiellement dans le foie, le cerveau et les TA, compense la diminution de l'apport en C16:0 dans les régimes. Cet effet activateur des TCM sur la synthèse *de novo* des AG a déjà été constaté (Carnielli et al., 1996). Il n'est pas retrouvé chez les rats nourris avec les régimes hyperlipidiques HF-8 et 21, dans les tissus desquels une masse plus faible de C16:0 est mesurée par rapport au contrôle. Cela peut être dû à la nature hyperlipidique des régimes, connue pour inhiber la lipogenèse *de novo* (Duarte et al., 2014).

Les quantités d'acides gras monoinsaturés (AGMI) présents dans les mélanges lipidiques utilisés pour les régimes MF et HF sont identiques et constituées essentiellement de C18:1 n-9. Les différents régimes n'ont pas eu d'effet sur la masse et la nature des AGMI mesurés dans le cerveau, le cœur et le muscle des groupes MF, CR et HF.

Les quantités d'acides gras polyinsaturés (AGPI) incorporés dans les régimes sont également identiques, avec un ratio $\frac{LA}{ALA}$ égal à 3,8. Les différents apports en Tri-C8:0 ont peu modifié la composition des AGPI dans le cerveau, le cœur et le muscle gastrocnémien. Seule une légère baisse de la masse d'acide linoléique (LA) dans le cœur ainsi qu'une diminution de la masse d'acide docosapentaénoïque (DPA) dans le muscle gastrocnémien dans les groupes MF-8 et MF-21, comparés au contrôle, ont été observées.

Tableau 11. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en acides gras du tissu adipeux épididymal des rats ayant consommé les régimes HF et CR

AG (mg/g TAE)	Régimes HF			Test stat.	
	0%	8%	21%		
C8:0	0.0 ± 0.0	2.8 ± 0.8	5.9 ± 0.8	****	↗
C12:0	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1	**	↘
C14:0	4.4 ± 0.7	5.8 ± 1.3	4.6 ± 0.8	-	
C16:0	158.9 ± 21.8	168.6 ± 35.2	121.8 ± 10.8	**	↗↘
C18:0	15.4 ± 2.6	19.0 ± 5.1	17.6 ± 1.2	-	
Σ Saturés	183.8 ± 25.0	201.5 ± 39.5	154.4 ± 12.4	*	↗↘
C 16:1 n-9	2.3 ± 0.3	2.8 ± 0.7	3.1 ± 0.4	*	↗
C 16:1 n-7	19.4 ± 3.1	21.8 ± 5.7	17.4 ± 2.2	-	
C18:1 n-9	361.7 ± 40.3	443.8 ± 55.4	447.3 ± 21.8	***	↗
C18:1 n-7	15.0 ± 2.3	18.9 ± 5.1	20.9 ± 1.0	**	↗
C 20:1 n-9	1.7 ± 0.4	2.1 ± 0.3	2.4 ± 0.1	*	↗
Σ Mono-insaturés	400.4 ± 44.0	489.6 ± 65.6	491.1 ± 23.0	***	↗
C18:2 n-6	81.5 ± 6.5	98.1 ± 10.5	99.7 ± 5.0	***	↗
C18:3 n-3	15.2 ± 1.0	17.7 ± 1.7	18.8 ± 1.0	***	↗
C20:4 n-6	1.0 ± 0.7	0.9 ± 0.8	1.0 ± 0.3	-	
Σ Poly-insaturés	98.1 ± 7.2	117.4 ± 11.5	119.9 ± 5.9	***	↗

AG (mg/g TAE)	Régimes CR			Test stat.	
	0%	8%	21%		
C8:0	0.0 ± 0.0	1.8 ± 0.4	3.8 ± 0.2	**	↗
C12:0	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.0	0.7 ± 0.0	-	
C14:0	6.2 ± 4.7	8.7 ± 1.2	10.2 ± 1.3	-	
C16:0	210.2 ± 15.2	190.0 ± 21.4	190.3 ± 26.7	-	
C18:0	19.5 ± 1.9	18.7 ± 3.2	21.7 ± 2.9	-	
Σ Saturés	237.5 ± 18.2	220.7 ± 26.0	227.7 ± 30.2	-	
C 16:1 n-9	3.3 ± 0.4	3.4 ± 0.5	3.8 ± 0.9	-	
C 16:1 n-7	45.4 ± 5.0	47.5 ± 2.1	52.0 ± 8.7	-	
C18:1 n-9	397.8 ± 26.4	375.0 ± 10.5	369.6 ± 48.6	-	
C18:1 n-7	25.3 ± 1.2	28.8 ± 2.8	32.1 ± 6.3	-	
C 20:1 n-9	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.7	-	
Σ Mono-insaturés	473.4 ± 30.7	456.2 ± 12.3	459.3 ± 61.6	-	
C18:2 n-6	71.3 ± 5.2	66.9 ± 1.1	63.0 ± 8.6	-	
C18:3 n-3	12.5 ± 1.2	11.1 ± 0.5	11.6 ± 0.8	-	
C20:4 n-6	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	-	
Σ Poly-insaturés	84.2 ± 6.8	78.8 ± 1.5	75.8 ± 9.2	-	

Les valeurs sont exprimées en mg d'acide gras/g de tissu adipeux ± Écart-type

Ainsi, la substitution des AGCL par des AGCM ne modifie pas la masse et la nature des lipides dans le cerveau, le cœur et le muscle gastrocnémien de rats mâles. Une étude chez le rat a pourtant observé que la consommation de triglycérides à chaîne moyenne (TCM) à la place de triglycérides à chaîne longue (TCL), dans un régime hyperlipidique, diminue le stockage des lipides dans le cœur et le muscle gastrocnémien (Han et al., 2003). Cependant, ce résultat a été observé avec des régimes TCL et TCM contenant respectivement 49,6 et 46,8 % de l'AET sous forme de lipides, dont 97 % d'AGCM dans le régime TCM. Cela constitue une dose très haute d'AGCM et un apport trop faible en AG essentiels. Les différences observées entre notre étude et celle de Han *et al.* peuvent donc s'expliquer par l'écart des apports en AGCM, 5 à 10 fois moindres dans nos régimes (MF et HF-8 et 21). D'autre part, les effets de la matière grasse laitière, contenant des AGCM, sur l'augmentation de la biodisponibilité en DPA dans le cœur (Legrand et al., 2010) et en DHA dans le cerveau (Delplanque et al., 2013; Du et al., 2012) (cf. § 2.4) ne sont pas observés dans notre étude. Il est possible que l'effet de la matière grasse laitière sur la préservation des AGPI à longue chaîne dans le cerveau et le cœur ne soit pas dû aux AGCM, mais à d'autres composants du lait (vitamines, protéine ou AGCC) ou même un effet synergique des acides gras du lait.

A.2.4.1. Effets de la dose de Tri-C8:0 sur le métabolisme lipidique du foie

Dans notre étude, l'apport plus élevé en Tri-C8:0 augmente significativement la masse des LT (acides gras, phospholipides, cholestérol) mesurée dans le foie des rats nourris avec un régime modérément riche en lipides (10% en masse), mais pas avec un régime hyperlipidique (25% en masse) (**Figure 19**). Cet effet de la Tri-C8:0 est observé sur les AGS, les AGMI et les AGPI (**Tableau 8**) ; les masses de C14:0, C16:0, C16:1 (n-7 et 9), C18:1 (n-7 et 9), LA et DPA sont significativement plus élevées dans les foies des rats MF-8 et -21 que dans ceux des rats MF-0. Les quantités de ces acides gras tendent à augmenter dans les foies des rats en restriction calorique (CR-8 et 21) par rapport au contrôle, mais de manière non significative. Ainsi, l'effet des AGCM sur la disponibilité des AGPI dans le foie, décrit dans certaines études (Ezanno et al., 2014), est ici observé, mais cet effet n'est pas spécifique des polyinsaturés puisque les AGS et les AGMI sont aussi affectés.

Tableau 12. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la composition en acides gras du tissu adipeux sous-cutané des rats ayant consommé les régimes MF

AG (mg/g TA SC)	Régimes MF			K-W test	
	0%	8%	21%		
C8:0	0.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2	2.1 ± 0.6	****	↗
C12:0	1.9 ± 0.4	2.4 ± 0.7	2.2 ± 0.7	-	
C14:0	9.6 ± 0.8	11.7 ± 1.5	12.5 ± 1.9	**	↗
C16:0	198.5 ± 19.7	212.3 ± 19.1	195.9 ± 39.4	-	
C18:0	18.1 ± 1.3	19.7 ± 2.3	21.4 ± 2.7	-	
Σ Saturés	228.4 ± 20.9	247.3 ± 21.1	234.2 ± 43.3	-	
C 16:1 n-9	3.8 ± 0.6	3.9 ± 0.9	4.2 ± 1.1	-	
C 16:1 n-7	36.8 ± 7.3	40.6 ± 13.5	44.8 ± 16.1	-	
C18:1 n-9	365.4 ± 43.4	403.9 ± 38.6	412.7 ± 68.1	-	
C18:1 n-7	28.2 ± 2.9	31.8 ± 5.0	37.6 ± 7.3	**	↗
Σ Mono-insaturés	434.3 ± 50.3	480.2 ± 51.0	499.3 ± 87.6	-	
C18:2 n-6	68.1 ± 7.7	74.8 ± 10.7	78.7 ± 12.9	-	
C18:3 n-3	9.1 ± 1.2	9.5 ± 1.5	11.1 ± 1.6	-	
C20:4 n-6	1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.3	0.8 ± 0.2	-	
Σ Poly-insaturés	78.4 ± 8.4	85.2 ± 12.1	90.6 ± 14.3	-	

Les valeurs sont exprimées en mg d'acide gras/g de tissu adipeux ± Écart-type

L'effet de la consommation de TCM sur le métabolisme des lipides et le stockage des triglycérides dans le foie est plutôt décrit comme neutre, chez l'homme (40 g/jour) (Nosaka et al., 2002), voire même en faveur d'une diminution de l'accumulation des lipides induite par la consommation d'alcool, chez le rat (TCM équivalent à 30% de l'AET) (Li et al., 2013). Un tel effet des AGCM n'est pas souvent mentionné dans les études *in vivo*, mais la plupart ont été réalisées avec des doses très hautes de TCM (parfois 70% de l'AET), dans des régimes hyperlipidiques. Or, dans les groupes HF-0, 8 et 21 de notre étude, l'effet de la Tri-C8:0 sur la masse de lipides dans le foie n'est effectivement pas observé.

Afin d'expliquer l'accumulation de lipides dans le foie suite à un apport chronique en Tri-C8:0 équivalent à 1,7 et 4,4% de l'AET, l'expression des ARN_m codant pour FAS et l'activité de l'enzyme malique ont été mesurées (**Figure 20**), mais l'augmentation de l'apport en Tri-C8:0 compensée par la diminution en AGCL n'influence pas significativement ces enzymes. Pourtant, des études ont montré que les AGCM n'inhibent pas l'enzyme malique, contrairement aux AGCL (Crozier et al., 1987), et favorisent même l'expression du gène *Fasn* (Takase et al., 1977). Il est possible que l'effet des régimes sur ces deux enzymes ait été masqué par le jeûne de 18 h avant le sacrifice, celui-ci pouvant inhiber l'activité de l'enzyme malique et l'expression de l'enzyme FAS *via* l'inhibition de SREBP-1c (Gosmain et al., 2005).

Bien que les régimes MF-0, 8 et 21 contiennent le même apport en lipides, on peut supposer que la substitution d'AGCL, principalement transportés jusqu'aux organes périphériques (tissus adipeux, muscles), par du C8:0, atteignant rapidement le foie en passant par la veine porte, augmente la quantité de lipides absorbés par le foie. Il est possible que cela entraîne une augmentation de la quantité d'acétyl-CoA disponible pour la synthèse *de novo* des acides gras, après β -oxydation du C8:0. De plus, il est possible que l'acide octanoïque exerce un effet indirect sur la synthèse *de novo* des acides gras hépatiques, *via* la ghréline. En effet, le foie synthétise la GOAT (Lim et al., 2011), la ghréline et le récepteur GHSR-1a (Uribe et al., 2008), suggérant un effet autocrine. Il a été montré que l'injection périphérique de ghréline chez le rat augmentait l'expression des gènes de la lipogenèse et le contenu du foie en triglycéride, mais diminuait ce dernier paramètre dans le muscle gastrocnémien, supposant donc un effet de la ghréline en faveur d'un dépôt de triglycérides spécifique au foie

Tableau 13. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur la composition en acides gras du tissu adipeux sous-cutané des groupes HF et CR

AG (mg/g TA SC)	Régimes HF			K-W test	
	0%	8%	21%		
C8:0	0.2 ± 0.2	1.4 ± 0.7	3.3 ± 0.8	****	↗
C12:0	2.0 ± 0.3	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.6	-	
C14:0	5.5 ± 0.5	5.6 ± 1.6	4.8 ± 1.2	-	
C16:0	159.0 ± 11.9	129.4 ± 29.5	94.9 ± 14.0	***	↘
C18:0	14.4 ± 1.4	14.1 ± 3.8	14.5 ± 2.7	-	
Σ Saturés	181.1 ± 13.4	152.0 ± 34.1	119.1 ± 17.6	**	↘
C 16:1 n-9	2.2 ± 0.2	3.6 ± 3.2	2.6 ± 0.3	-	
C 16:1 n-7	14.4 ± 2.5	15.7 ± 7.5	11.3 ± 3.5	-	
C18:1 n-9	350.9 ± 18.3	350.3 ± 52.6	353.3 ± 54.2	-	
C18:1 n-7	15.1 ± 1.3	16.5 ± 3.8	18.2 ± 2.8	-	
Σ Mono-insaturés	382.5 ± 19.1	386.1 ± 61.1	385.4 ± 58.4	-	
C18:2 n-6	81.3 ± 5.5	81.0 ± 12.4	83.1 ± 13.6	-	
C18:3 n-3	11.2 ± 1.4	11.5 ± 3.0	13.2 ± 3.1	-	
C20:4 n-6	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.4	0.9 ± 0.3	-	
Σ Poly-insaturés	93.4 ± 6.6	93.3 ± 15.2	97.3 ± 16.4	-	

AG (mg/g TA SC)	Régimes CR			K-W test	
	0%	8%	21%		
C8:0	0.2 ± 0.2	1.3 ± 0.2	2.9 ± 0.8	**	↗
C12:0	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.8	1.9 ± 0.9	-	
C14:0	7.8 ± 0.7	7.5 ± 0.8	9.5 ± 1.0	-	
C16:0	162.7 ± 15.5	143.8 ± 23.1	156.7 ± 13.0	-	
C18:0	17.3 ± 1.1	15.2 ± 4.6	18.9 ± 3.2	-	
Σ Saturés	189.2 ± 16.8	169.2 ± 28.2	189.9 ± 18.0	-	
C 16:1 n-9	2.8 ± 0.3	2.4 ± 0.4	2.7 ± 0.4	-	
C 16:1 n-7	35.2 ± 5.4	34.2 ± 6.4	37.8 ± 2.2	-	
C18:1 n-9	324.8 ± 48.6	267.6 ± 30.5	318.4 ± 15.6	-	
C18:1 n-7	21.9 ± 3.8	20.6 ± 0.5	25.6 ± 4.0	-	
C 20:1 n-9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	
Σ Mono-insaturés	384.7 ± 56.6	324.8 ± 37.6	384.6 ± 21.4	-	
C18:2 n-6	61.3 ± 9.1	46.9 ± 3.5	57.3 ± 5.5	-	
C18:3 n-3	9.0 ± 1.7	6.5 ± 1.2	8.5 ± 0.8	-	
C20:4 n-6	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.4	0.5 ± 0.3	-	
Σ Poly-insaturés	70.8 ± 10.6	53.9 ± 4.4	66.2 ± 6.2	-	

Les valeurs sont exprimées en mg d'acide gras/g de tissu adipeux ± Écart-type

(Barazzoni et al., 2005). Cela pourrait aussi être lié à l'effet de la ghréline sur le neuropeptide Y qui favorise l'accumulation de lipides dans le foie, mais pas dans le muscle (Kamegai et al., 2001). Il serait nécessaire de valider cet effet de la Tri-C8:0 sur la masse de lipides dans le foie par des analyses complémentaires (coupes de foie pour observer les gouttelettes lipidiques, analyse des gènes *fasn*, *srebp-1c*, *ppar-α* chez des rats nourris).

A.2.4.1. Effets de la dose de Tri-C8:0 sur le métabolisme lipidique dans les TA

La composition du tissu adipeux épидидymal (TAE), généralement assez représentatif de la composition des régimes, et du tissu adipeux sous-cutané (TA SC) dont les caractéristiques morphométriques (diamètre des adipocytes) ont été discutées dans la partie A.1., sont présentées dans les **Tableaux 11 à 13**. Peu d'effets de la dose de Tri-C8:0 sont observés dans les groupes MF et CR ; seule la masse de C8:0 augmente (**P<0.0001), ainsi que celle de C14:0 dans le TA SC des groupes MF. Pour les groupes HF, comme observé dans les autres tissus, la masse de C16:0 est significativement plus basse dans le TA SC et le TAE lorsque l'apport en Tri-C8:0 est plus important, entraînant globalement une baisse de la masse des AGS totaux. Une augmentation forte de la masse des AGMI et des AGPI est mesurée dans le TAE des groupes HF-8 et 21 comparés au groupe HF-0, mais pas dans le TA SC. Les compositions en acide gras des TA mésentérique (TAM) et brun (TAB) ne sont pas significativement modifiées par les régimes (*données non incluses*). Ainsi, la préservation des AGPI à chaîne longue suite à la consommation de matière grasse laitière, constatée dans d'autres études, n'est observée avec la Tri-C8:0 que pour l'ALA, dans le TAE des rats ayant reçu des régimes hyperlipidiques.

L'effet de la dose de Tri-C8:0 sur l'augmentation du diamètre moyen des adipocytes du TA SC (article 1), sans augmentation de la masse de ce tissu, est également observé pour le TAM (**Figure 21**). Cet effet ne semble pas activer la production de facteurs pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α) (**Figure 22**) et n'est *a priori* pas lié à une dérégulation de l'expression de FAS, de SREBP et de PPAR γ (*données non incluses*).

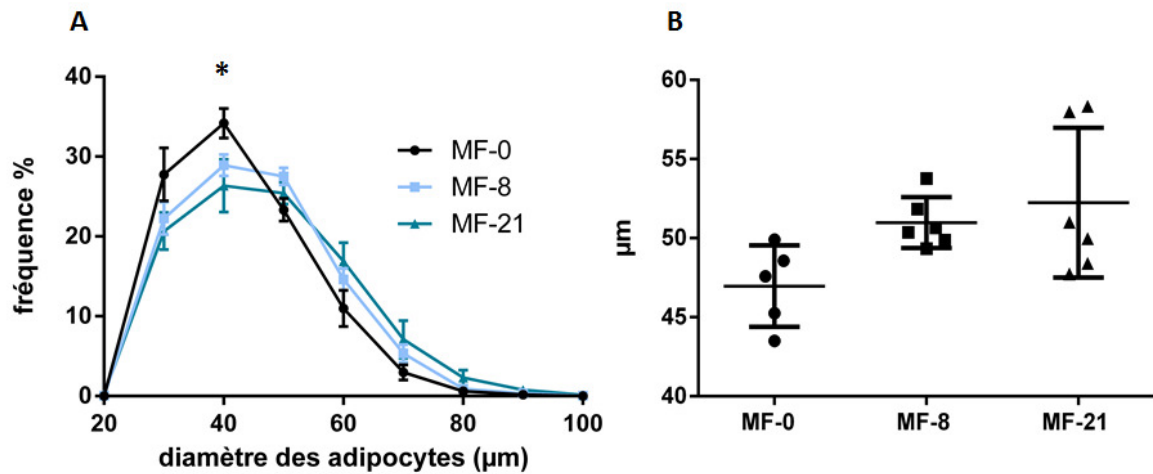


Figure 21. Effet de la dose de Tri-C8:0 sur la distribution des adipocytes du TA méésentérique dans les groupes MF, selon leur diamètre

A) Fréquence de distribution des adipocytes selon leur diamètre (µm). Comparaisons multiples, * $P < 0,05$. B) Diamètre moyen des adipocytes (µm). ANOVA non paramétrique (Kruskal-Wallis), * $P = 0,032$. Les données sont exprimées sous la forme de moyenne \pm S.E.M.

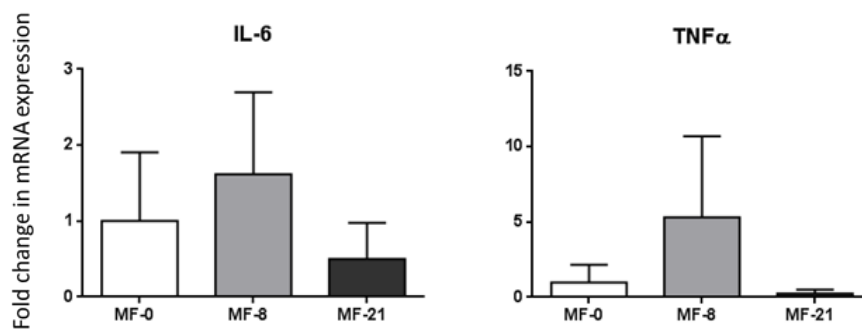


Figure 22. Effet de la dose de Tri-C8:0 alimentaire sur l'expression d'IL-6 et TNF-α dans le TA méésentérique

ANOVA non paramétrique (Kruskal-Wallis) : IL-6, $P = 0,17$; TNF-α, $P = 0,08$. Données exprimées sous la forme moyenne \pm S.E.M.

Conclusion de la partie A

Les résultats obtenus dans cette étude *in vivo* montrent que la consommation d'acide octanoïque entraîne un enrichissement spécifique (dose-dépendant) des cellules de l'estomac en C8:0, alors que cet acide gras n'est pas (ou peu) stocké dans les autres tissus (faible stockage dans le tissu adipeux). Cependant, l'augmentation de la disponibilité du co-substrat lipidique (C8:0-CoA) de la GOAT n'entraîne pas d'augmentation de la concentration en ghréline octanoylée dans le plasma, mais une diminution de la concentration plasmatique en ghréline non acylée, ce qui se traduit par une augmentation du ratio ghréline acylée/non acylée. La mesure de l'expression des ARNm de la préproghréline (PPG) dans l'estomac suggère une diminution d'expression de ce peptide. Aucun effet sur la consommation alimentaire ou la prise de poids n'est observé chez les rats en croissance, ce qui est cohérent avec la stabilité de la concentration en ghréline acylée. Une augmentation de l'expression des ARNm de l'hormone IGF-1, régulée par la GH, dans le foie est mesurée. L'augmentation de la dose de C8:0 entraîne également une augmentation du diamètre moyen des adipocytes dans les tissus adipeux mésentérique et sous-cutanée. Ces résultats suggèrent une absorption gastrique du C8:0, après hydrolyse de la Tri-C8:0 par la lipase préduodénale. La partie qui suit s'intéresse donc à la démonstration et la quantification de l'absorption gastrique ainsi qu'à son effet sur l'acylation de la ghréline.

Partie B

B. Démonstration de l'absorption gastrique du C8:0, ingéré sous forme de Tri-C8:0, par inhibition de la lipase préduodénale et effet sur la ghréline octanoylée et non acylée dans le plasma, chez le raton

La partie B présente une 2^{ème} approche physiologique ayant pour objectifs de démontrer et quantifier l'absorption gastrique de l'acide octanoïque, ingéré sous forme de Tri-C8:0. Le but est également de comprendre l'effet de cette potentielle absorption gastrique et de son inhibition sur les concentrations en ghréline octanoylée et non octanoylée, dans le plasma. Les résultats des recherches sont présentés sous la forme d'un article intitulé « Effect of preduodenal lipase inhibition in suckling rats on dietary octanoic acid (C8:0) gastric absorption and plasma octanoylated ghrelin concentration », qui sera soumis en février 2016.

B.1. Contexte et objectifs de l'étude

L'article 1 a montré que la consommation chronique de trioctanoïne entraîne un enrichissement spécifique en C8:0 dans les cellules de l'estomac (Lemarié et al., 2015a). Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une hydrolyse précoce des TCM par la lipase préduodénale, suivie d'une absorption gastrique de l'acide octanoïque. La fonction d'absorption de l'estomac est pourtant considérée comme très limitée. *A priori*, seules quelques molécules telles que l'éthanol, la caféine et certains médicaments (aspirine) peuvent entrer dans les cellules de la muqueuse gastrique. L'importance de l'absorption de ces molécules dépend notamment du temps de vidange gastrique (Holt, 1981). Quelques études assez anciennes ont émis l'hypothèse d'une absorption gastrique des AGCM qui pourrait être « massive » (Perret, 1982), mais les résultats ne sont pas mis en relation avec l'octanoylation de la ghréline, ces travaux étant antérieurs à sa découverte. De plus, ces expérimentations ont été réalisées dans des modèles qui augmentent le temps de contact des acides gras avec la paroi stomacale, par la ligature du pylore et parfois même de la cardia, ce qui augmente potentiellement l'absorption par les cellules de la muqueuse et s'éloigne de la réalité physiologique (Egelrud et al., 1971; Helander, 1970).

L'objectif de cette 2^{ème} étude *in vivo* est de vérifier l'hypothèse de l'absorption gastrique de l'acide octanoïque après hydrolyse des triglycérides par la lipase préduodénale, d'estimer quantitativement cette absorption et de comprendre le lien avec l'acylation de la ghréline. Le modèle animal utilisé est le rat Sprague-Dawley mâle âgé de 15 jours, chez qui l'activité de la lipase préduodénale, d'origine linguale, est forte. Pour cette étude, nous avons collaboré avec le Dr. F. Carrière et le Dr. J.-F. Cavalier (EIPL UMR7282 CNRS, Marseille, France) qui nous

ont fourni l'inhibiteur sélectif de la lipase préduodénale (*BemPPOX*) et ont réalisé les tests *in vitro* d'inhibition de cette lipase. La partie *in vivo* a été réalisée au laboratoire de biochimie et Nutrition Humaine : le *BemPPOX* a été administré aux rats dans des émulsions lipidiques contenant de la trioctanoïne marquée au carbone 13 et de la trioléine, en comparaison de contrôles sans inhibiteur et sans trioctanoïne. Les effets de l'inhibition de la lipase linguale sur l'absorption gastrique de l'acide octanoïque et sur la sécrétion de la ghréline octanoylée et non octanoylée dans le plasma, ont ainsi été étudiés.

B.2. Article 2

Effect of preduodenal lipase inhibition in suckling rats on dietary octanoic acid (C8:0) gastric absorption and plasma octanoylated ghrelin concentration

F. Lemarié^{1§}, J.-F. Cavalier^{2§}, C. Garcia¹, F. Boissel¹, V. Point², D. Catheline¹, P. Legrand¹, F. Carrière², V. Rioux^{1*}

¹Agrocampus Ouest-INRA, USC 1378, Laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine, Rennes, France

²CNRS, Aix-Marseille Université, UMR 7282, Enzymologie Interfaciale et de Physiologie de la Lipolyse, Marseille, France

[§]These authors contributed equally to this work

*** Corresponding author:** Pr. Vincent RIOUX
Laboratoire de Biochimie-Nutrition Humaine
Agrocampus Ouest-INRA USC1378
65, rue de Saint-Brieuc, CS 84215
35042 RENNES Cedex, FRANCE
Tel: +33 2 23 48 55 47
E-mail: vincent.rioux@agrocampus-ouest.fr

Key words: octanoic acid, lingual lipase, preduodenal lipase, gastric absorption, gastric mucosa, ghrelin, Ghrelin O-Acyltransferase, acylation, octanoylation

Abbreviations: BemPPOX, 5-(2-(Benzyloxy)ethoxy)-3-(3-PhenoxyPhenyl)-1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-one; FA, fatty acid; FFA, free fatty acid; GHSR-1a, growth hormone secretagogue receptor 1 a; GOAT, ghrelin O-acyltransferase; MCFA, medium chain fatty acid; LCFA, long chain fatty acid; RLL, rat preduodenal/lingual lipase; RPL, rat pancreatic lipase; TG, triglyceride

Abstract

Part of medium chain fatty acids (MCFAs) coming from dietary triglycerides (TG) can be directly absorbed through the gastric mucosa after the action of preduodenal lipase (lingual lipase in the rat). MCFA gastric absorption, particularly that of octanoic acid (C8:0), may have a physiological importance in the octanoylation of ghrelin, the orexigenic gastric peptide acting as an endogenous ligand of the hypothalamic growth hormone secretagogue receptor 1a (GHSR-1a). However, the amount of C8:0 absorbed in the stomach and its metabolic fate still haven't been clearly characterized. The purpose of the present study was to further characterize and quantify the importance of preduodenal lipase activity on the release and gastric absorption of dietary C8:0 and on the subsequent ghrelin octanoylation in the stomach mucosa. Fifteen days old rats received fat emulsions containing triolein or [1,1,1-¹³C]-Tri-C8:0 and a specific inhibitor of preduodenal lipase, 5-(2-(Benzyloxy)ethoxy)-3-(3-PhenoxyPhenyl)-1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-one or BemPPOX. The fate of the ¹³C-C8:0 was followed in rat tissues after 30 and 120 min of digestion and octanoylated ghrelin was measured in the plasma. This work (1) demonstrates that part of C8:0 coming from Tri-C8:0 is directly absorbed at the gastric level, (2) allows the estimation of C8:0 gastric absorption level (1.3 % of the ¹³C-C8:0 in *sn*-3 position after 30 min of digestion), as well as (3) the contribution of rat lingual lipase to total lipolysis and to duodenal absorption of dietary FAs (at least 30 %), (4) shows no short-term effect of dietary Tri-C8:0 consumption and subsequent increase of C8:0 gastric tissue content on plasma octanoylated ghrelin concentration.

Introduction

The hydrolysis of dietary TGs begins under the action of preduodenal lipase (gastric in humans (Carrière et al., 1993; Moreau et al., 1988b) or lingual in rats (Fernando-Warnakulasuriya et al., 1981)) and is carried on in the small intestine by pancreatic lipase (Kawai et al., 2003; Lowe, 2002). Apart from the release of around 10 to 25 % of TG acyl chains in the stomach (Lengsfeld et al., 2004), preduodenal lipase is described as playing two important roles. First, it triggers the subsequent action of pancreatic lipase (Gargouri et al., 1986a). Secondly, it drives the early release of short and medium chain FAs (MCFAs) from milk TGs because of its stereo-preference for the hydrolysis of the ester bond at the *sn*-3 position of TG (Carrière et al., 1997; Jensen et al., 1994).

MCFAs include hexanoic acid (C6:0), octanoic acid (C8:0) and decanoic acid (C10:0). They are present in dairy products (Jensen et al., 1990) and in specific oils like coconut oil (Takeuchi et al., 2008). Their synthesis has been described only in the lactating mammary gland of ruminant (Kumar et al., 1981) and non-ruminant species (Libertini et al., 1978). They display physical and metabolic properties distinct from those of long-chain fatty acids (LCFAs ≥ 12 carbons) (Bach et al., 1982). Part of MCFAs coming from the diet may be directly absorbed by the cells of the stomach mucosa (Perret, 1980) after the action of preduodenal lipase (Aw et al., 1980; Egelrud et al., 1971; Perret, 1982). The amount of FAs involved in this gastric absorption, the mechanism of absorption and the subsequent gastric metabolic fate of these FAs still haven't been clearly described (Lai et al., 1998; Perret, 1980).

The ghrelin peptide has been identified precisely in the cells of the oxyntic mucosa (Kojima et al., 1999) as the endogenous ligand of the hypothalamic growth hormone secretagogue receptor-1a (GHSR-1a) (Howard et al., 1996). This 28-amino acid peptide is the only known hormone with an orexigenic effect and also the only case of a protein subjected to a post-translational octanoylation, catalyzed by the ghrelin O-acyltransferase (GOAT) (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008a). The octanoylation corresponds to the formation of an oxyester bond between C8:0 and the 3rd N-terminal serine residue of the ghrelin. The acylated ghrelin secreted in the plasma is the only form that can bind to GHSR-1a (Bednarek et al., 2000). Octanoylated ghrelin regulates many relevant biological processes including

growth hormone (GH) secretion, appetite and glucose homeostasis (Delporte, 2013). The GOAT preferentially links ghrelin to C8:0 but can also use C6:0, C10:0 and C10:1 as substrates to a lesser extent (Darling et al., 2015). This enzyme, described by some authors as a “fat sensor” informing the brain of the nutrient availability in the digestive tract (Taylor et al., 2013), is seen as a potential target for the control of body weight and finding GOAT inhibitors might be a way to treat diseases such as diabetes and obesity (Barnett et al., 2010; Darling et al., 2015).

Another way to regulate the circulating octanoylated ghrelin could be to control the availability of C8:0. Because no endogenous synthesis has been described in animal, except in the lactating mammary gland, dietary C8:0 has been suspected of providing the GOAT enzyme with the octanoyl-CoA co-substrate necessary for the acylation of the ghrelin in the gastric cells, before its secretion in the plasma. Our previous work on dietary Tri-C8:0 dose effect in rats showed a specific dose-response enrichment of C8:0 in the stomach tissue, supporting the hypothesis of an early preduodenal hydrolysis of trioctanoin by rat lingual lipase and direct absorption at the gastric level (Lemarié et al., 2015a). The plasma acylated ghrelin concentration was unchanged in spite of the increased C8:0 availability. Conversely, a reproducible decrease in the plasma concentration of unacylated ghrelin was observed (Lemarié et al., 2015a).

A previous study on the discriminative inhibition of mammalian digestive lipases showed that 5-alkoxy-3-(3-PhenoxyPhenyl)-1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-one compounds were specific inhibitors of preduodenal lipase (*i.e.*, gastric and lingual lipases) (Point et al., 2012a). Among this family of inhibitors, 5-(2-(Benzyloxy)ethoxy)-3-(3-PhenoxyPhenyl)-1,3,4-Oxadiazol-2(3H)-one (BemPPOX – **Supplementary Figure S1**) was selected to further characterize and quantify the importance of preduodenal lipase activity on dietary C8:0 gastric absorption and on stomach ghrelin octanoylation. Fifteen days old suckling rats received fat emulsions containing [1,1,1-¹³C]-Tri-C8:0 and the specific inhibitor of lingual lipase. The metabolic fate of the ¹³C-C8:0 was followed in rat tissues after different times of digestion and octanoylated and unacylated ghrelin concentrations were measured in the plasma.

Materials and Methods

Chemicals

Solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) or Thermo Fisher Scientific (Elancourt, France). Trioctanoin ($\geq 99\%$), Bovine serum albumin (BSA), sodium taurodeoxycholate (NaTDC), calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), benzamidine, 4-morpholineethanesulfonic acid (MES), sodium deoxycholate (NaDC; $\geq 97\%$) and L- α -phosphatidylcholine from soybean Type II-S (14-23% choline) were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium chloride (NaCl) and Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) were purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France) and from Euromedex (Mundolsheim, France), respectively. Trioctanoin (1,1,1- $^{13}\text{C}_3$ 99 %) was from Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, USA). Triolein ($\geq 80\%$) was from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). Rat plasma acylated and unacylated ghrelin enzyme immunoassay kits (EIA) were purchased from SPI-Bio (Montigny le Bretonneux, France).

The preduodenal lipase inhibitor BemPPOX (5-(2-(Benzyloxy)ethoxy)-3-(3-PhenoxyPhenyl)-1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-one) was synthesized at the laboratory of Enzymology at Interfaces and Physiology of Lipolysis (EIPL UMR7282 CNRS, Marseille, France) following reported procedures (Baringhaus et al., 2002; Point et al., 2012a). Target compound was obtained at $>98\%$ purity as determined by HPLC analysis. BemPPOX chemical structure was supported by analysis of the ^1H & ^{13}C NMR spectra and high resolution mass spectrometry (HRMS: ESI, m/z $[\text{M}+\text{H}^+]$ calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_5$: 405.1445 Da; found: 405.1446 Da).

Sources of enzymes for *in vitro* lipase inhibition

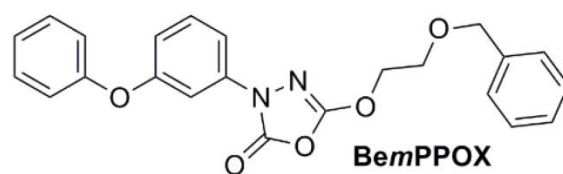
Rat pancreatic juice was collected from Sprague-Dawley rats under caerulein (68 ng/kg per h) and secretin (1.3 units/kg per h) stimulation (De Caro et al., 1998). The pancreatic juice was next mixed with a solution of protease inhibitors, PMSF and benzamidine, each at a final concentration of 2 mM. The mixture was immediately lyophilized and the resulting powder was stored at -20 C before use. The lipase activity of lyophilized rat pancreatic juice was found to be 30 ± 1.5 U per mg, which corresponds to around 0.4 % w/w of rat pancreatic

lipase (RPL). A stock solution of 3 mg/mL rat pancreatic juice (12 µg/mL RPL; 90 U/mL) in 10 mM MES (pH 7.0) was used for inhibition assays.

Rat lingual lipase (RLL) was partially purified from serous glands of rat tongues as previously described (Field et al., 1983). Briefly, the homogenate of the lingual serous glands in cold 150 mM NaCl was centrifuged at $100,000 \times g$ for 60 min. The supernatant, containing the lipase activity, was precipitated with 30-60% saturated ammonium sulfate. The precipitates of protein were solubilized in buffer solution (4.5 mM citric acid and 11 mM Na_2HPO_4) at pH 5.4. Proteins were precipitated by adding the latter enzyme preparation to 2 vol. of cold acetone at -20°C . After centrifugation, the recovered proteins were solubilized in buffered solution at pH 5.4. The mixture was then centrifuged at $12,000 \times g$ at -10°C for 20 min and the resultant clear supernatant was separated and lyophilized. The resulting powder containing RLL was further stored at -20°C before use. The lipase activity of lyophilized proteins from rat tongue extract was found to be 2.4 ± 0.04 U per mg of lyophilized powder, which corresponds to around 0.24 % w/w of RLL. A stock solution of 10 mg/mL rat tongue extract (24 µg/mL RLL; 24 U/mL) in 10 mM MES (pH 6.0), 150 mM NaCl, was used for inhibition assays.

Lipid emulsions composition

Four oil-in-water emulsions were prepared using triolein and triolein (Supplementary Table S1). The emulsions were composed of 33% (v/v) of an oil phase and 67% (v/v) of an aqueous solution with sodium deoxycholate (1.5 mg/mL), L- α -phosphatidylcholine from soybean (26.2 mg/mL) and sucrose (0.1 g/mL). The emulsifiers were dispersed in water by sonicating the mixture for 5 min. The lipid mixes used for the control emulsions (Triolein and Triolein with BemPPOX) contained only triolein (150 mg/0.5 mL final emulsion/rat). The lipid mixes used for the triolein emulsions ($\text{Tri}^{13}\text{C-C8:0}$ and $\text{Tri}^{13}\text{C-C8:0}$ with BemPPOX) contained triolein (100 mg/0.5 mL final emulsion/rat) and $[1,1,1-^{13}\text{C}]\text{-Tri-C8:0}$ (50 mg/0.5 mL final emulsion/rat). Triolein and $\text{Tri}^{13}\text{C-C8:0}$ emulsions with the preduodenal lipase inhibitor BemPPOX were prepared so that each rat ingested 5 mg of BemPPOX per kg of body weight. The triolein was here used as a control because there is no described gastric absorption of oleic acid. The four emulsions were isolipidic with the same TG concentration



Supplementary Figure S1. Chemical structure of the oxadiazolone inhibitor, the 5-(2-(Benzyloxy)ethoxy)-3-(3-PhenoxyPhenyl)-1,3,4-Oxadiazol-2(3*H*)-one.

(150 mg/0.5 mL) and the same phospholipid concentration (8.5 mg/0.5 mL). The oil phase and the aqueous phase were emulsified by sonicating the mixture for 1 min.

Animals

All protocols complied with the European Union Guideline for animal care and use (2003/35/CEE). The experimental procedure (N°2015112615183758) was approved by the French Animal Care Committee (Rennes) and the Ministry of Higher Education and Research, in compliance with recommendations of the 2013-118 directive for animal experimentation. Thirty-six 7-days old male Sprague-Dawley rats and 6 lactating female Sprague-Dawley rats were purchased from Janvier breeding center (Le Genest Saint Isle, France). The lactating females were fed ad libitum with standard growth diet and had free access to water. Each female with 6 suckling rats was housed in one cage at 19 °C-23 °C with a 12 h light-dark cycle. After 1 week of acclimatization, the 15-days old rats (average weight of $37.3 \text{ g} \pm 5.14 \text{ g}$) were separated from the lactating females during 3 h (at 7:30 a.m.). Each rat received then 0.5 mL of emulsion by oral administration (at 10:30 a.m.) dispensed slowly with plastic transfer pipettes, in order to let the rats salivate and swallow, as saliva contains lingual lipase. Each control emulsion (Triolein and Triolein with BemPPOX) was given to 6 rats, and each triolein emulsion (Tri¹³C-C8:0 and Tri¹³C-C8:0 with BemPPOX) to 12 rats. After 30 and 120 min, 3 rats of each control group and 6 rats of each triolein group were anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (140 mg/kg) (Merial, Lyon, France) and blood samples were collected by cardiac punctures. The liver, the stomach, the gastric content and the small intestine were collected. The liver and gastric contents were directly snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. The stomach and small intestine were emptied, rinsed with ice-cold saline solution, respectively dissected in fundus, corpus, antrum, and in duodenum, jejunum and ileum; then the dissected parts were snap-frozen and stored at -80 °C.

Lipid extraction and FA analysis

Lipids from plasma, liver, stomach tissue (fundus, corpus, antrum), gastric content and intestine (duodenum, jejunum, ileum) were extracted using a mixture of hexane/isopropanol (3:2 v/v), after acidification with 1 mL HCl 3 M and homogenization with an Ultra-Turrax® in 2 mL PBS (Rioux et al., 2005). Heptanoic acid (C7:0), nonanoic acid (C9:0), undecanoic

Supplementary Table S1. Oil-in-water emulsion compositions

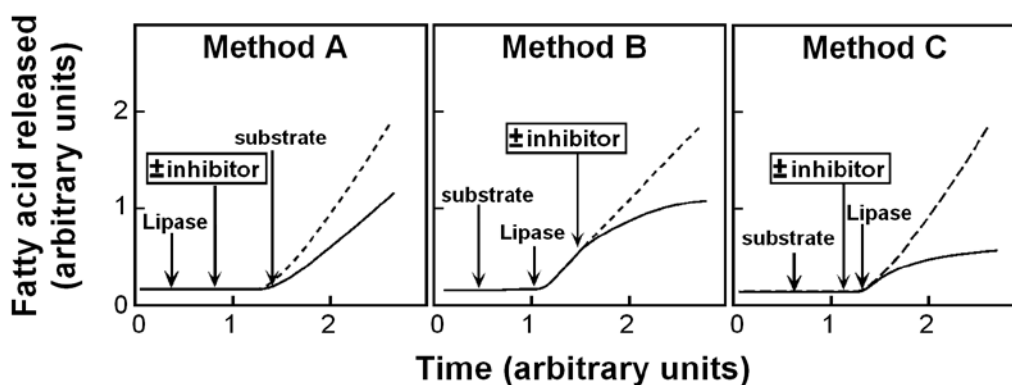
	Control emulsions		Trioctanoin emulsions	
	Triolein	Triolein with BemPPOX	Tri ¹³ C-C8:0	Tri ¹³ C-C8:0 with BemPPOX
Water (mL)	0.33	0.33	0.33	0.33
Sodium deoxycholate (mg)	0.5	0.5	0.5	0.5
L- α -phosphatidylcholine (mg)	8.5	8.5	8.5	8.5
sucrose (mg)	33	33	33	33
Triolein (mg)	150	150	100	100
[1,1,1- ¹³ C]-Tri-C8:0	0	0	50	50
BemPPOX (mg/kg)	0	0.15-0.25	0	0.15-0.25
Total volume (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5

Masses and volumes for 0.5 mL emulsion which corresponds to the volume given to each rat

acid (C11:0) and heptadecanoic acid (C17:0) were added as internal standards in order to quantify C6:0 and C8:0 (with C7:0), C10:0 (with C9:0), C12:0 and C14:0 (with C11:0) and longer chain FAs (with C17:0). The total lipid extracts were slowly air-dried on silica plates to ensure the recovery of volatile short and medium chain FAs. The collected FAs were transmethylated for 30 min at 70°C with 2 mL H₂SO₄ in methanol (1:10 v/v) (Liu, 1994) and FA methyl esters (FAMES) extracted by adding 0.5 mL hexane and 8 mL NaCl 0.9% (in deionized water) (Rioux et al., 2005). The hexane phase was directly analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) using an Agilent Technologies 7890N gas chromatograph (Bios Analytic, Toulouse, France) with a bonded silica capillary column (60 m × 0.25 mm; BPX 70, SGE, Villeneuve-St-Georges, France) with a polar stationary phase of 70% cyanopropylpolysilphenylene-siloxane (0.25 mm film thickness) (Rioux et al., 2013). Helium was used as carrier gas (average velocity 24 cm/s). Injection volumes were from 0.1 to 2 µL depending on the tissue, in splitless mode at 250 °C. The oven temperature program started at 45°C for 3 min. Then, the temperature ramped firstly at 10 °C/min to 150 °C, then at 1.4°C/min to 220 °C and at 40 °C/min to 260 °C and was held at 260 °C for 2 min. Mass detection data were obtained in full scan mode with a mass range of *m/z*. 50–550 atomic mass unit (amu). The NIST (National Institute of Standards and Technology) database (version 2.01) was used for FAMES identification. The area under the peaks was determined using ChemStation software (Agilent) and results were expressed as % of total FAs or as mg/g of tissue after calculation with reference to the internal standards.

Measure of the enrichment in carbon 13

The carbon 13 (¹³C) enrichment in FAs was estimated directly from FAME analysis by GC-MS. The mass spectrometer was operated under electron impact ionization conditions (electron energy 70 eV, source temperature 230 °C) in SIM (selected-ion monitoring) mode to monitor the respective abundance of the ¹³C-FA and ¹²C-FA molecular ions. A standard curve was obtained with FA standard mixes with known ¹³C/¹²C ratios in order to calculate the enrichment in ¹³C (in ¹³C atom %) as a function of the ¹³C-FA area / (¹²C-FA area + ¹³C-FA area) ratio. The concentration of ¹³C-FA (in mg/g of tissue) was calculated by multiplying the abundance in ¹³C atom by the concentration of the total FA.



Supplementary Figure S2. Methods used for studying lipase inhibitors. With each method, arrows indicate the order of successive additions of inhibitor, lipase, and substrate. Adapted from Gargouri *et al.*, 1997.

Table 1. Levels (%) of rat lingual (RLL) and rat pancreatic (RPL) lipase inhibition by the BemPPOX compound ^a

Lipase inhibition method	Lipase	BemPPOX concentration (μM)	Lipase inhibition (%)
<i>Method A</i>	RLL	7	47.1 ±1.4
		28	70.5 ±1.7
		700	87.9 ±1.6
		1,000	93.2 ±1.1
	RPL	700	12.8 ±0.91
		2,800	14.1 ±0.20
<i>Method B</i>	RLL	1,000	92.2 ±1.9
	RPL	1,000	12.1 ±0.45
<i>Method C</i>	RLL	1,000	97.3 ±3.4
	RPL	1,000	13.8 ±0.67

^a Lipase residual activity was measured with the pH-stat technique at 37 °C using a Tri-C8:0 emulsion and three distinct inhibition methods (A, B and C) as described in **Materials and Methods** section. Results are expressed as means ± SD of at least three independent assays (CV% < 5.0%).

Measure of acylated and unacylated ghrelin in plasma

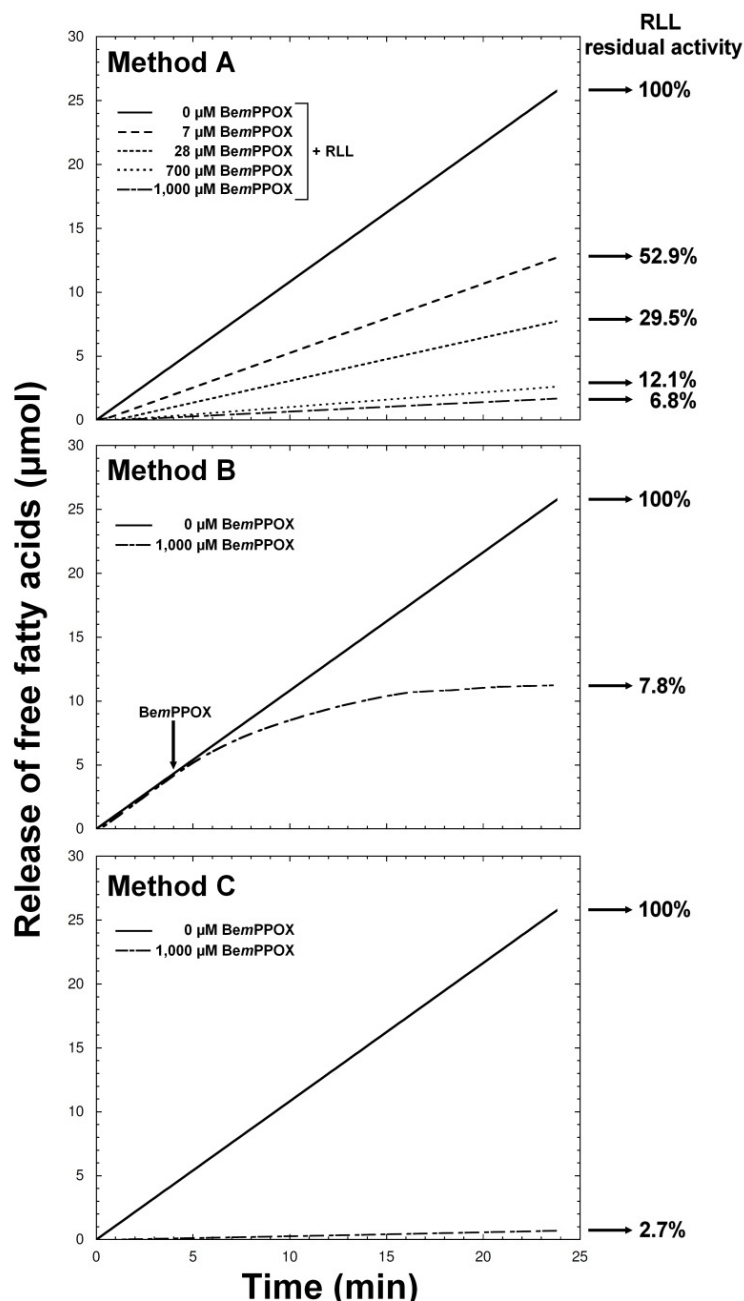
Blood samples collected by cardiac puncture were immediately mixed with EDTA (1 mg/mL blood) and with the serine protease inhibitor *p*-hydroxymercuribenzoic acid (PHMB, 0.4 μ M final) to protect the acylated ghrelin from enzymatic deacylation (Hosoda et al., 2012). The plasma was rapidly separated from the blood cells by centrifugation and acidified by adding HCl (0.1 N final) to preserve ghrelin acylation, as well. Plasma samples were then stored at -80 °C for later hormone titration. The acylated and unacylated ghrelin concentrations were assayed with the commercial EIA kits according to the manufacturer's instructions (Chen et al., 2012).

Lipase activity measurements

Enzymatic activity was assayed at 37 °C by measuring the amount of free fatty acid (FFA) released from a mechanically stirred triolein (Tri-C8:0) emulsion, using 0.1 N NaOH with a pH-stat (Metrohm 718 STAT Titrino, Switzerland) adjusted to a fixed end point value as previously described (Point et al., 2012a, 2012b). The triglyceride emulsion was formed by mixing 0.5 mL Tri-C8:0 with 14.5 mL assay solution. The activity of rat pancreatic lipase (RPL) contained in lyophilized rat pancreatic juice was determined at pH 8.0 using the pancreatic standard assay solution: 0.3 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, and 4 mM NaTDC (Erlanson et al., 1970). The activity of rat lingual lipase (RLL) was determined at pH 5.5 using the preduodenal lipase standard assay solution: 150 mM NaCl, 2 mM NaTDC, 1.5 μ M BSA (Gargouri et al., 1986b; Moreau et al., 1988a). All experiments were performed at least in triplicate. Activities were expressed as international units: 1 U = 1 μ mole FFA released per minute.

In vitro lipase inhibition by BemPPOX

Three different methods of inhibition ([Supplementary Figure S2](#)), depending on the order of addition of lipase, substrate and inhibitor, were used (Ransac et al., 1997). Method A (lipase/inhibitor pre-incubation) was set up to test in aqueous medium and in the absence of substrate, the possible direct reactions between a lipase and potential inhibitors as previously described (Point et al., 2012a). The lipase (RLL or RPL) was pre-incubated with BemPPOX for 30 min at 25 °C at various inhibitor concentrations (7 to 1,000 μ M final concentration in



Supplementary Figure S3. Typical kinetic recordings of the hydrolysis of trioctanoin emulsions by RLL at pH 5.5 using the pH-stat technique.

Method A: RLL was pre-incubated for a 30-min period with various BemPPOX concentrations (7 to 1,000 μM final concentration in the incubation medium) and then the lipase residual activity was measured. **Method B:** RLL inhibition by addition of BemPPOX (1,000 μM final concentration) in the course of the lipolysis reaction. After 4 min of reaction, BemPPOX was subsequently added, and the release of fatty acids (μmol per min) was recorded for an additional time of 20 min. **Method C:** the residual lipase activity was measured after mixing BemPPOX (1,000 μM final concentration) with the emulsified trioctanoin substrate 5 min prior to adding RLL. Kinetic assays were performed as described in **Materials & Methods** section. The kinetics shown here are representative of individual experiments performed at least in triplicate ($\text{CV}\% < 5\%$).

the incubation medium) and in the presence of 4 mM NaTDC in order to create a micellar solution containing the inhibitor molecules (Marguet et al., 1994; Point et al., 2012a). Sample of the incubation medium was then collected and injected into the pH-stat vessel in order to measure the residual lipase activity. Method B (inhibition during lipolysis) was designed to test whether lipase inhibition occurred in the presence of the water-insoluble substrate during lipolysis. The lipase (RLL or RPL) was first injected into the pH-stat vessel containing the emulsified Tri-C8:0 substrate maintained under vigorous stirring. After 4 min of hydrolysis recorded at constant pH (5.5 for RLL or 8.0 for RPL), BemPPOX was added in the course of the lipolysis reaction in the assay mixture and the release of fatty acids ($\mu\text{mol per min}$) was recorded for an additional time of 20 min. Method C (“poisoned” interface) was used to test the possible reactions between lipases and inhibitors in the presence of substrate (Gargouri et al., 1997). Five minutes before adding the lipase, BemPPOX was added into the pH-stat vessel thus allowing the formation of mixed inhibitor/substrate emulsions. After lipase injection, the hydrolytic activity was then continuously recorded using the pH-stat technique.

To be consistent with the *in vivo* experiments, a BemPPOX concentration of 1,000 μM , corresponding to the mean concentration of inhibitor present in the oil-in-water emulsions given to rats (0.15-0.25 mg BemPPOX in 0.5 mL lipid emulsion – [Supplementary Table S1](#)), was used with Methods B and C.

In each case, a stock solution of 5 mg/mL BemPPOX in dimethyl sulfoxide (DMSO) was used. Control experiments were performed in the absence of inhibitor but with the same volume of DMSO. It is worth noting that DMSO at a final volume concentration of less than 10% has no effect on the enzyme activity.

Statistical analysis

Statistical analyses were realized using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Group differences were analyzed by non-parametric Mann-Whitney U tests (2 groups) or by non-parametric one-way analysis of variance (Kruskal-Wallis test) (>2 groups), with Dunn’s post hoc tests. Two-way analysis of variance (two-ways ANOVA) (not repeated measures) were used to analyze the effect of emulsion type and time. All Data are

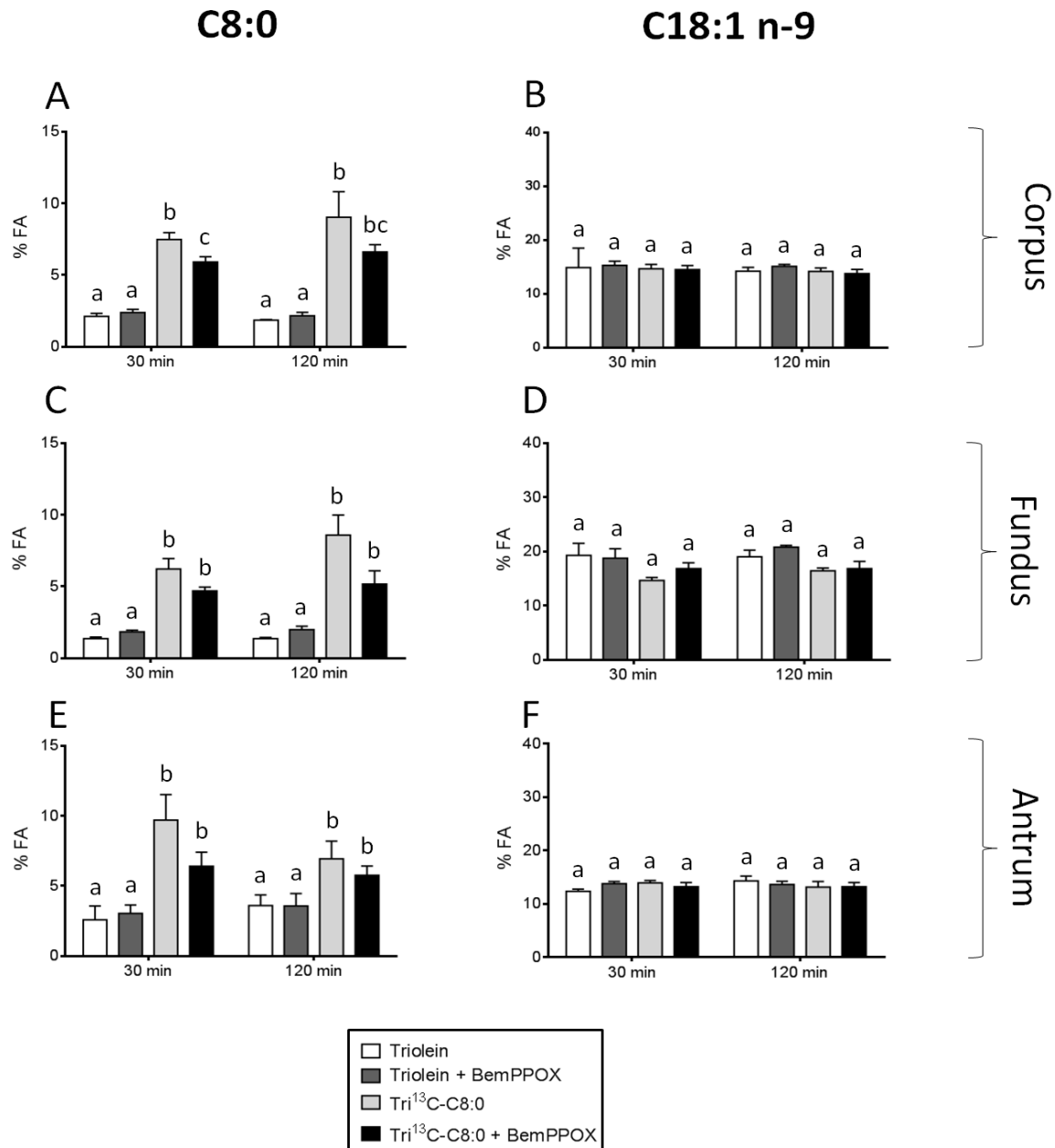


Figure 1. Effects of dietary C8:0 and preduodenal lipase inhibition on C8:0 gastric tissue content, 30 and 120 min after emulsion ingestion.

A) C8:0 contents in the corpus. Two-way ANOVA test: emulsion effect, p -value<0.0001 (letters showing statistical differences were assigned with Dunn's post hoc tests). **B)** C18:1 n-9 contents (in % of FAs) in the corpus. Two-way ANOVA test: emulsion effect: p -value=0.744. **C)** C8:0 contents in the fundus. Two-way ANOVA test: emulsion effect, p -value<0.0001. **D)** C18:1 n-9 contents in the fundus. Two-way ANOVA test: emulsion effect, p -value=0.003, Dunn's post hoc tests p -value>0.05. **E)** C8:0 contents in the antrum. Two-way ANOVA tests: emulsion effect, p -value=0.002. **F)** C18:1 n-9 contents in the antrum. Two-way ANOVA test: emulsion effect, p -value=0.949.

expressed as the mean \pm SEM and for all tests, p -value <0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

***In vitro* selective inhibition of rat preduodenal lipase by BemPPOX**

The inhibition of rat preduodenal/lingual (RLL) and pancreatic (RPL) lipases by BemPPOX was assessed using three different methods depending upon the order of addition of the lipase, the lipid substrate and the inhibitor (**Supplementary Figure S2**) (Ransac et al., 1997). The lipase activity was measured on Tri-C8:0 emulsions at 37 °C using the pH-stat technique. In all cases linear kinetics of free fatty acids release (μmol) vs. time (min) were obtained. The slope ($U = \mu\text{mol}/\text{min}$) was calculated by applying linear regression ($r^2 > 0.99$) in order to assess the residual activity of the inhibited lipases.

When RLL was pre-incubated (Method A) with various amounts of BemPPOX, the enzyme lost about 70% of its initial activity in presence of 28 μM inhibitor, and was fully inactivated at 1,000 μM inhibitor after 30 min of incubation (**Table 1** and **Supplementary Figure S3**). The IC_{50} value of BemPPOX acting on RLL was estimated to be 7.0 μM under these conditions. When BemPPOX was added in the pH-stat reaction vessel 4 min after the lipolysis of the Tri-C8:0 emulsion by RLL was launched (Method B; **Supplementary Figure S3**) or when the inhibitor was pre-mixed with Tri-C8:0 prior to lipase addition (**Method C; Supplementary Figure S3**), the rate of Tri-C8:0 hydrolysis by RLL was drastically reduced by 92% and 97%, respectively (**Table 1**).

Conversely, when BemPPOX was tested on RPL under similar conditions, lipase inhibition was very weak whatever the method used, even at very high inhibitor concentration (**Table 1**).

Preduodenal lipase inhibition significantly decreases C8:0 content in the stomach mucosa

The effect of lingual lipase inhibition on stomach octanoic acid (FA) absorption was studied in 4 groups of suckling rats (**Supplementary Table S1**). Two control groups received

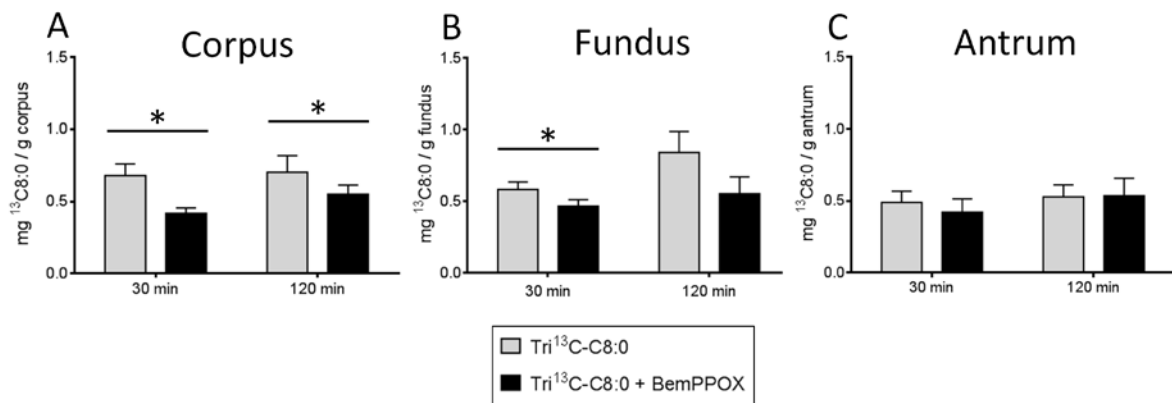


Figure 2. Effect of preduodenal lipase inhibition on ^{13}C -C8:0 gastric tissue content, 30 and 120 min after emulsion ingestion.

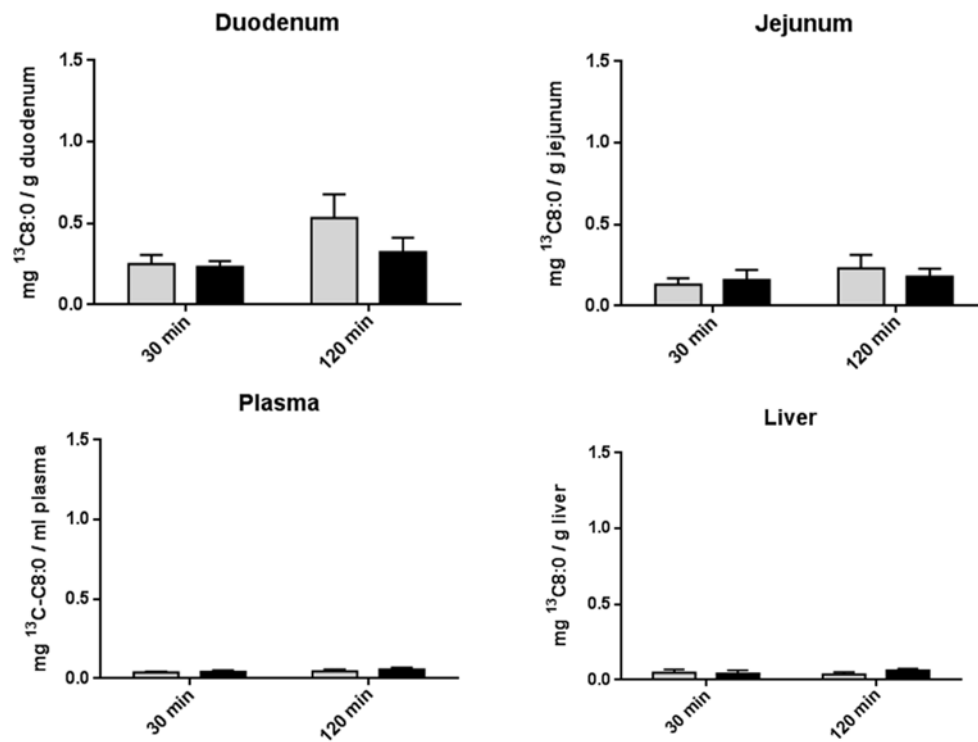
A) Concentrations of ^{13}C -C8:0 (mg/g of corpus) in the corpus of the Tri ^{13}C -C8:0 and Tri ^{13}C -C8:0 with BemPPOX groups. Two-way ANOVA test: Interaction effect, p -value=0.505; Time effect, p -value=0.334; Inhibitor effect, p -value=0.017. Mann-Whitney (M-W) test: * p -value<0.05. **B)** Concentrations of ^{13}C -C8:0 (mg/g of fundus) in the fundus of the Tri ^{13}C -C8:0 and Tri ^{13}C -C8:0 with BemPPOX groups. Two-way ANOVA test: Interaction, p -value=0.404; Time, p -value=0.056; Inhibitor, p -value=0.097. M-W: * p -value<0.05. **C)** Concentrations of ^{13}C -C8:0 (mg/g of antrum) in the antrum of the Tri ^{13}C -C8:0 and Tri ^{13}C -C8:0 with BemPPOX groups. Two-way ANOVA test: Interaction, p -value=0.69; Time, p -value=0.43; Inhibitor, p -value=0.76.

a 150-mg Triolein emulsion without lipase inhibitor (1) and with the preduodenal lipase inhibitor BemPPOX (2), respectively. Two other groups, called trioctanoin groups, received the Tri¹³C-C8:0 emulsion containing 100 mg of triolein and 50 mg of trioctanoin (3) and the Tri¹³C-C8:0 with BemPPOX emulsion containing 100 mg of triolein, 50 mg of trioctanoin and BemPPOX (4), respectively.

The FA composition (% of total FAs) was measured in the different parts of the gastric mucosa (corpus, fundus, and antrum). In the corpus, 30 and 120 min after emulsion ingestion (**Figure 1.A**), the C8:0 basal levels represented 2.2% of total FAs in the triolein group without BemPPOX. This value was not modified by the addition of the lipase inhibitor in the Triolein with BemPPOX group. When 50 mg of triolein were substituted with trioctanoin in the Tri¹³C-C8:0 emulsion, the C8:0 in the corpus (total C8:0, ¹³C and ¹²C) significantly increased to 7.5% of total FAs after 30 min and to 9% after 120 min. BemPPOX addition to the trioctanoin emulsion significantly reduced the C8:0 to 5.9% of total FAs after 30 min (p -value < 0.05) and to 6.6% after 120 min (p -value = 0.08). Conversely, in the corpus mucosa, none of the treatments modified the C18:1 n-9 content (**Figure 1.B**). However, no effect on total mass of FAs between the 4 groups in the corpus was observed (*data not shown*).

In the two other parts of the stomach (fundus and antrum), trioctanoin emulsions also significantly increased the C8:0 levels compared with control triolein emulsions (**Figure 1.C and 1.E**). Like in the corpus, BemPPOX addition decreased the amount of C8:0 in the fundus and in the antrum mucosa, although not significantly (p -value = 0.07 and 0.08). Again, no effect of the emulsions was shown on C18:1 n-9 levels (**Figure 1.D and 1.F**).

These results demonstrate therefore that the ingestion of trioctanoin emulsions significantly increased the C8:0 contents in the gastric tissue (fundus, corpus and antrum) whereas the addition of the preduodenal lipase inhibitor significantly lowered C8:0 contents in the corpus.



Supplementary Figure S4. Effect of preduodenal lipase inhibition on ^{13}C -C8:0 content, 30 and 120 min after emulsion ingestion (duodenum, jejunum, plasma and liver). Two-way ANOVA tests showed no significant effect of the BemPPOX (p -value>0.05)

Preduodenal lipase inhibition significantly prevents ^{13}C -C8:0 gastric absorption from (1,1,1- ^{13}C)-Tri-C8:0 emulsion

In order to quantify more precisely the mechanisms leading to a higher C8:0 content in stomach, we used ^{13}C -C8:0 as a tracer and measured its abundance in the different parts of the stomach (**Figure 2**). After 30 and 120 min, the ^{13}C -C8:0 concentrations in the corpus were respectively equal to 0.67 and 0.70 mg/g of corpus in the Tri ^{13}C -C8:0 group (**Figure 2.A**). BemPPOX addition to the trioctanoin emulsion significantly reduced the ^{13}C -C8:0 concentrations to 0.41 mg/g of corpus after 30 min and to 0.55 mg/g of corpus after 120 min, in the Tri ^{13}C -C8:0 with BemPPOX group. After 30 and 120 min, the ^{13}C -C8:0 concentrations in the Tri ^{13}C -C8:0 group, were thus 40 and 30 % higher than in the Tri ^{13}C -C8:0 with BemPPOX group. In the fundus (**Figure 2.B**), the ^{13}C -C8:0 concentration was significantly higher after 30 min in the Tri ^{13}C -C8:0 group (0.60 mg/g of fundus) than in the Tri ^{13}C -C8:0 with BemPPOX group (0.45 mg/g of fundus). After 120 min, the ^{13}C -C8:0 concentration was also higher in the Tri ^{13}C -C8:0 group (0.84 mg/g of fundus) than in the Tri ^{13}C -C8:0 with BemPPOX group (0.55 mg/g of fundus) but the difference was not statistically significant. No significant differences in ^{13}C -C8:0 content were observed in the antrum (**Figure 2.C**). These results demonstrate the gastric absorption of ^{13}C -C8:0 from (1,1,1- ^{13}C)-Tri-C8:0 emulsion and its decrease in the presence of BemPPOX, especially in the corpus mucosa.

The distribution of dietary ^{13}C -C8:0 in other tissues was also studied (**Supplementary Figure S4**). In the trioctanoin groups, a small amount of ^{13}C -C8:0 was found in the plasma (0.04 and 0.05 mg/mL after 30 and 120 min) and in the liver (0.02 and 0.06 mg/g of liver after 30 and 120 min) but no significant differences were observed between the Tri ^{13}C -C8:0 group and the Tri ^{13}C -C8:0 with BemPPOX group. The measure of the ^{13}C enrichment in other FAs in the stomach and the liver showed no enrichment in any FAs and no difference between the Tri ^{13}C -C8:0 and Tri ^{13}C -C8:0 with BemPPOX groups (*data not shown*).

Preduodenal lipase inhibition also impairs duodenal total FA absorption

The effect of lingual lipase inhibition on the FA absorption in the small intestine parts was also studied. The total masses of FAs (mg/g of duodenum) were measured in the duodenum

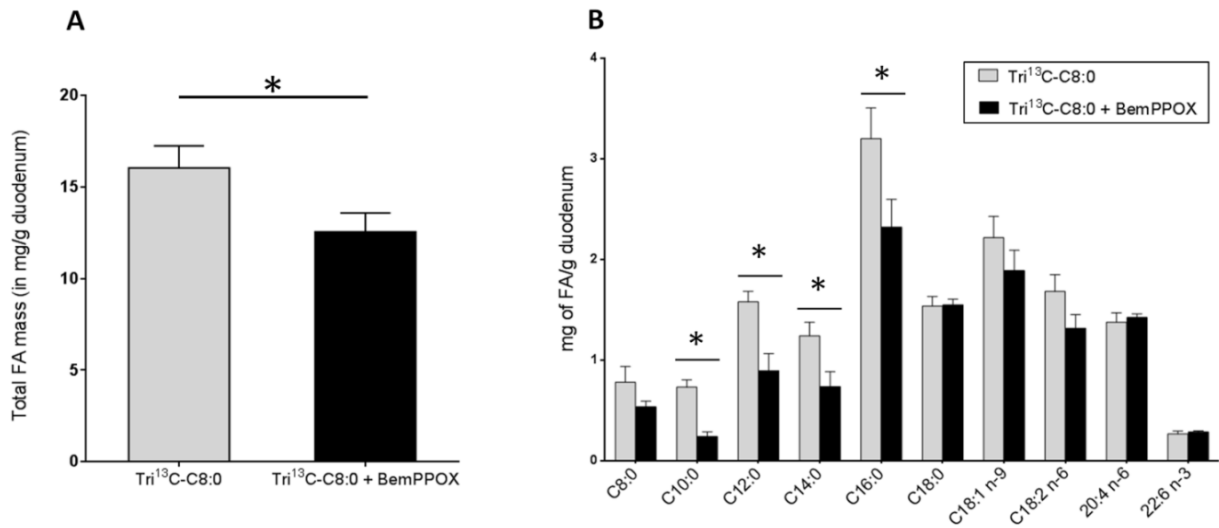


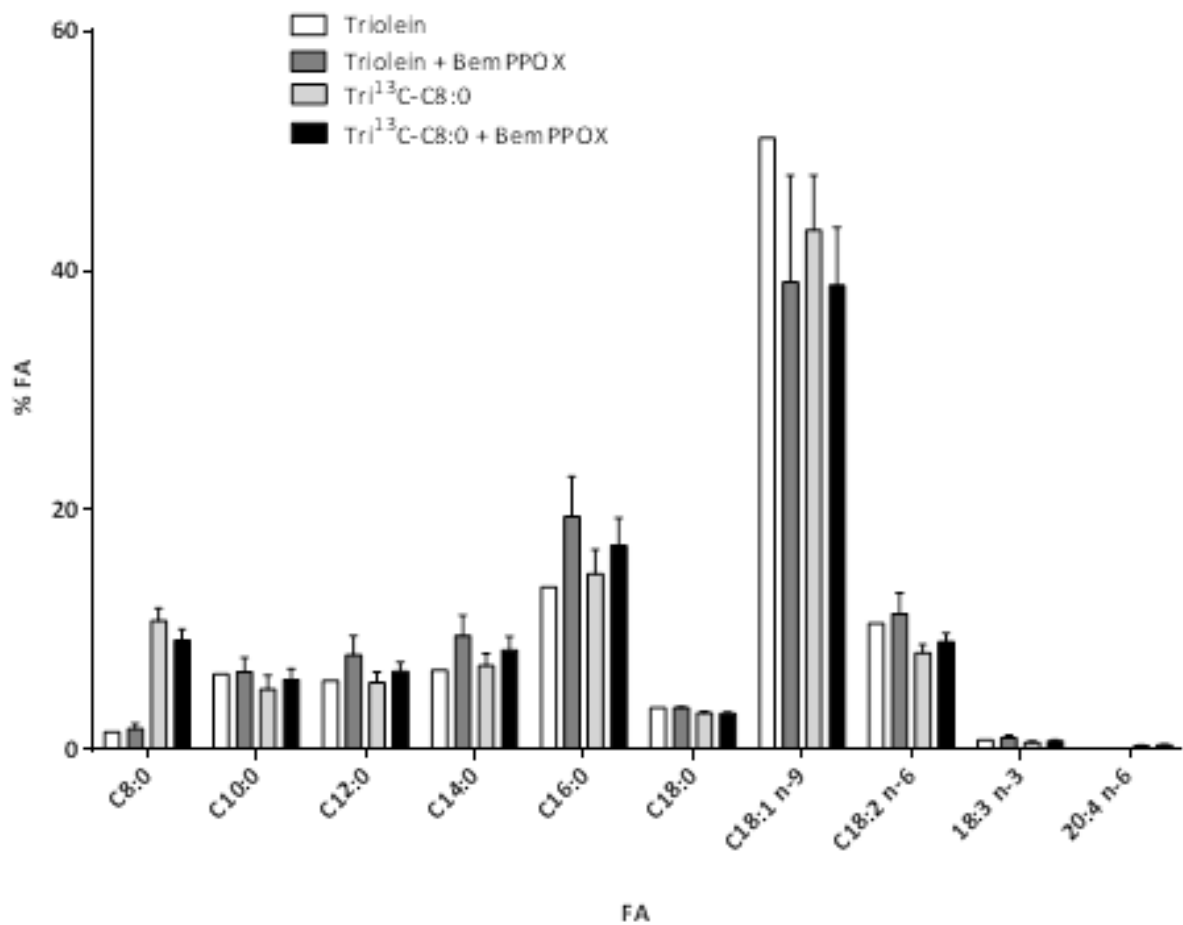
Figure 3. Effect of preduodenal lipase inhibition on the FA contents of duodenum tissue, 120 min after emulsion ingestion. **A)** Total mass of FAs in the duodenum (mg/g of duodenum) in the trioctanoin groups (\pm BemPPOX). Mann-Whitney (M-W) test: p -value=0.030. **B)** Mass of predominant FAs in the duodenum tissue (mg/g of duodenum) in the trioctanoin groups \pm BemPPOX. M-W: * p -value<0.05.

tissue of the two triolein groups. **Figure 3.A** shows results obtained 120 min after emulsion ingestion, since there was no effect after 30 min. The total mass of FA in the Tri¹³C-C8:0 group (16 mg/g of duodenum) was 30% significantly higher than in the Tri¹³C-C8:0 with BemPPOX group (12.5 mg/g of duodenum) (p -value=0.03). **Figure 3.B** details the masses of predominant FAs in the duodenum after 120 min of emulsion ingestion. The masses of C10:0, C12:0, C14:0 and C16:0 were significantly higher in the Tri¹³C-C8:0 group compared to the Tri¹³C-C8:0 with BemPPOX group. Some of these FAs were not present in the emulsion lipids but come from the maternal milk since they were present in the gastric content, even after 3 h of fasting (**Supplementary Figure S5**). The masses of total C8:0 (**Figure 3.B**) and ¹³C-C8:0 (**Supplementary Figure S4**) were also higher in the Tri¹³C-C8:0 group compared with the Tri¹³C-C8:0 with BemPPOX group, although not significantly.

These results demonstrate that inhibition of the preduodenal lipase with the BemPPOX inhibitor significantly decreased the FA absorption at the duodenal level, 120 min after the emulsion ingestion. Not surprisingly, no effect of the lipase inhibition was observed 120 min after the emulsion ingestion on the FA content of the subsequent parts of the intestine, the jejunal and ileal mucosa (*data not shown*), as this time lapse was likely too short for the nutrients to reach these parts of the intestine.

Preduodenal lipase inhibition and subsequent decrease of C8:0 gastric absorption have no effect on plasma octanoylated ghrelin concentration

The acylated (*i.e.*, octanoylated) and unacylated ghrelin concentrations were measured in the plasma of the four groups of rats, 30 and 120 min after emulsion ingestion (**Figure 4**). The total ghrelin concentration in plasma was calculated by adding the acylated and unacylated ghrelin concentrations (**Figure 4.A** and **4.B**). No significant effect of the triolein emulsion was observed on the circulating acylated ghrelin compared with the triolein emulsions (average value of 56 ± 16 pg/mL plasma, at 30 min and 103 ± 24 pg/mL, at 120 min). The plasma acylated ghrelin concentrations were not either significantly modified by the presence of BemPPOX inhibitor in the Triolein with BemPPOX and Tri¹³C-C8:0 with BemPPOX groups. On the other hand, 30 min after emulsion ingestion, the unacylated ghrelin concentrations were significantly lower in the Tri¹³C-C8:0 group (268 ± 76 pg/mL plasma) compared with the control groups (625 ± 99 and 592 ± 80 pg/mL in the Triolein and Triolein



Supplementary Figure S5. Fatty acid composition of the solid gastric content after 30 min of digestion. FA content expressed in % of total FA. An accurate comparison between the different groups is impaired by the fact that we collected almost entirely the solid part of the gastric contents since it was difficult to collect in a reproducible and effective manner the liquid gastric content (mostly triolein and triolein coming from the emulsion). Thus, the point of this supplementary figure is to display the other FAs with a maternal milk origin and explained their presence in the duodenal cells.

with BemPPOX groups, respectively). This effect was not observed 120 min after emulsion ingestion. As a consequence of this lower unacylated ghrelin concentration in the Tri¹³C-C8:0 group, the total ghrelin was also significantly lower in this group compared with the control groups. The digestion of lipids is known to decrease total ghrelin secretion in the plasma (Degen et al., 2007), but it seems here that ghrelin secretion would be more strongly inhibited by octanoic acid than oleic acid. The unacylated ghrelin concentration was not modified by the presence of the inhibitor in the emulsion, after 30 and 120 min. Obviously, emulsions containing trioctanoin did not increase plasma octanoylated ghrelin concentration. Conversely, a decrease in unacylated ghrelin concentration was observed 30 min after trioctanoin emulsion ingestion. Preduodenal lipase inhibition did not modify the concentrations of octanoylated and unacylated ghrelin in plasma.

Figures 4.C and **4.D** show the acylated to total ghrelin ratios, 30 and 120 min after emulsion ingestion. No significant effects of the trioctanoin emulsions and of the inhibitor were observed, although the acylated to total ghrelin ratio tended to be decreased, after 30 min, by the Tri¹³C-C8:0 emulsion consumption.

Discussion

The digestion of dietary TGs starts in the upper gastrointestinal tract under the action of preduodenal lipase (Carrière et al., 1993; DeNigris et al., 1985; Hamosh et al., 1973; Iqbal et al., 2009; Perret, 1982). The metabolic fate of MCFAs, once they are released from TGs in the alimentary bolus, remains unclear. Their rapid gastrointestinal hydrolysis leads to duodenal absorption and to specific transport through the portal vein followed by rapid β -oxidation in the liver (Lemarié et al., 2015b), but at least part of MCFAs could be absorbed at the gastric level. Indeed, some old studies performed on 10-days old rats with ligatured pylorus and radiolabeled MCFAs have observed the radioactivity in the gastric cells and in the liver, in less than 30 min (Egelrud et al., 1971). Moreover, it has been shown in the rabbit that the early hydrolysis of TGs by preduodenal lipase, especially milk TGs esterified with MCFAs in *sn*-3 position, leads to the massive absorption of MCFAs in the gastric mucosa, after duodenal bulb ligation (Perret, 1980, 1982). Therefore, dietary TGs esterified with octanoic acid may directly provide stomach GOAT with octanoyl-CoA co-substrate, necessary for the

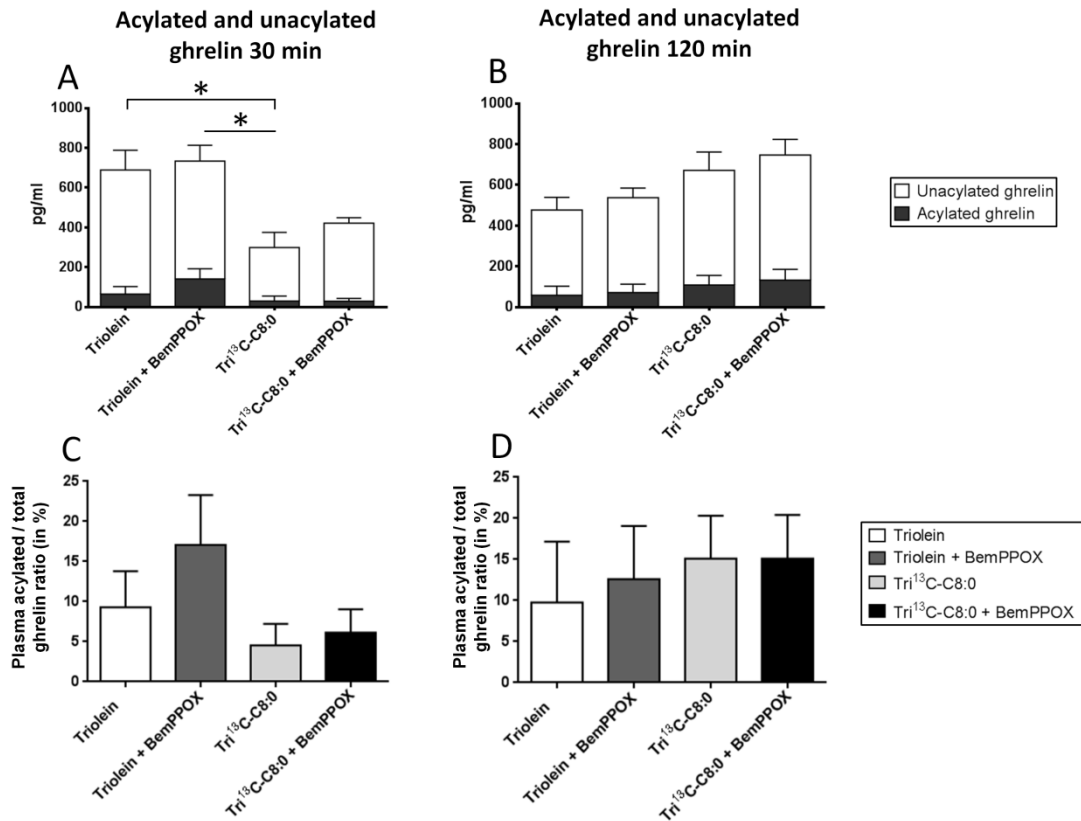


Figure 4. Effect of preduodenal lipase inhibition on plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations.

A) Plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations (pg/mL) 30 min after emulsion ingestion. Kruskal-Wallis (K-W) tests: acylated ghrelin, p -value=0.156; unacylated ghrelin p -value= 0.014; total ghrelin, p -value=0.011; Dunn's post hoc test * p -value<0.05. **B)** Plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations (pg/mL) 120 min after emulsion ingestion. K-W: acylated ghrelin, p -value=0.886; unacylated ghrelin, p -value=0.408; total ghrelin, p -value=0.332. **C)** Plasma acylated to total ghrelin ratios (% of total ghrelin) 30 min after emulsion ingestion. KW: p -value=0.328. **D)** Plasma acylated to total ghrelin ratios (% of total ghrelin) 120 min after the emulsion ingestion. KW: p -value=0.957.

octanoylation of ghrelin before its secretion in the plasma (Nishi et al., 2005a). However, this thesis still raises questions and points of controversy concerning the mechanism of gastric absorption, the amount of FAs involved, the effect of the age and the role of the preduodenal lipase activity.

In this work, we investigated the effect of preduodenal lipase inhibition on the gastric absorption of dietary C8:0 coming from trioctanoin, using a new lipase inhibitor (*BemPPOX*) of the oxadiazolone family (Ali et al., 2012; Point et al., 2012a). As expected from the first experiments made with oxadiazolone-core derivatives (Point et al., 2012a), *BemPPOX* exhibited a highly selective and potent inhibitory activity towards preduodenal/lingual lipase from rat tongue extracts and had no effect on pancreatic lipase from rat pancreatic juice (**Table 1 and Supplementary Figure S3**). Treating RLL with a 1,000 μM *BemPPOX* final concentration (i.e., the inhibitor concentration further used in *in vivo* experiments) resulted in full lipase inhibition.

In vivo, the presence of the *BemPPOX* preduodenal lipase inhibitor in the Trioctanoin emulsion led to a 25% lower C8:0 amount (^{12}C and ^{13}C -C8:0) in the corpus, compared with the Tri ^{13}C -C8:0 control group (**Figure 1**). This result was confirmed by the measure of the ^{13}C -C8:0 content in the corpus tissue (**Figure 2.A**) which showed that preduodenal lipase inhibition decreased respectively by 40 and 30% the ^{13}C -C8:0 concentrations after 30 and 120 min of digestion. A similar effect was observed in the fundus after 30 min of digestion (**Figure 2.B**) but not in the antrum (**Figure 2.C**). These data undoubtedly demonstrate the ^{13}C -C8:0 gastric absorption from (1,1,1- ^{13}C)-Tri-C8:0 and its partial inhibition by *BemPPOX*, especially in the corpus mucosa.

After 30 min of digestion, the corpus, fundus and antrum contained respectively 0.7, 0.6 and 0.5 mg of ^{13}C -C8:0/g of tissue, in the Tri ^{13}C -C8:0 group. This represented 0.65 mg ^{13}C -C8:0/g of stomach, given the average weigh of the stomach (170 ± 10 mg in which 80 mg of corpus). Similar results were observed after 120 min of digestion. Because the stomach ^{13}C -C8:0 concentration was measured at two isolated moments and not continuously, the potential β -oxidation of the ^{13}C -C8:0, its chain-elongation or its eventual secretion in the plasma after gastric absorption to peripheral organs (Egelrud et al., 1971) could lead to an underestimation

of the C8:0 gastric absorption. This is why the ^{13}C enrichment of other FAs and the ^{13}C -C8:0 concentrations in plasma and liver were measured (*data not shown*); However, no enrichment in ^{13}C of other FAs was observed, suggesting no chain-elongation of ^{13}C -C8:0 to C10:0, C12:0 or C14:0 and no synthesis of C16:0 using [1- ^{13}C]-acetyl-CoA.

Preduodenal lipase inhibition did not totally impair the ^{13}C -C8:0 gastric absorption. This finding could be explained by the fact that lingual lipase action begins 1-5 s after food ingestion (Kawai et al., 2003) and C8:0 could have been released from TGs before effective preduodenal lipase inhibition. This is especially true given that we used lipid emulsions which facilitate the action of preduodenal lipase (Lengsfeld et al., 2004). Another plausible explanation would rely on the fact that, *in vivo*, the rate of preduodenal lipase inhibition by BemPPOX may be lower than the one observed *in vitro*, due to the continuous secretion of lingual lipase by rat's tongue.

Whereas the contribution of human gastric lipase to gastrointestinal lipolysis is now well documented and is estimated to range from 10 to 25% of the overall hydrolysis of dietary TG (Lengsfeld et al., 2004; Roman et al., 2007), the contribution of rat lingual lipase (around 10-30% of the overall hydrolysis of dietary TG) is less described and based on old *in vitro* studies (Hamosh et al., 1979). In this work, we obtained new data on the *in vivo* effect of preduodenal lipase inhibition on intestinal FA absorption. After 120 min of digestion, the total mass of FAs in the duodenal tissue was significantly lower in the Tri ^{13}C -C8:0 with BemPPOX group than in the Tri ^{13}C -C8:0 group (**Figure 3.A**), due to a decrease in MCFAs but also C12:0, C14:0 and C16:0 (**Figure 3.B**) coming from the emulsion and from the maternal milk (**Supplementary Figure S5**). Since preduodenal and pancreatic lipases have a synergetic action in the GI tract (Gargouri et al., 1986a), the latter result could be explained by the fact that preduodenal lipase inhibition might have partially impaired pancreatic lipase action on LCFAs. Besides, it is nowadays known that the apparent specificity of preduodenal lipases for SCFAs and MCFAs is mainly due to the preferential release of these fatty acids found at the *sn*-3 position of milk TGs (Rogalska et al., 1993; Roman et al., 2007; Sams et al., 2016). Studies on gastric lipases have shown that these lipases can act at similar rates on TGs with various chain length and they have the potential to release all three fatty acids of TG molecules (Carrière et al., 1991; Gargouri et al., 1986b). As a result, oleic acid is the main

FFA found in the gastric contents of newborns fed with milk, even though their milk diet is enriched with medium chain TGs (Roman et al., 2007). Interestingly and in good agreement with these previous findings in humans, free oleic acid was abundantly found in solid gastric content of rats, after 30 and 120 min of emulsion digestion (*data not shown*).

Rat lingual lipase, like gastric lipase in humans, therefore contributes to part of TG digestion and absorption on its own and its inhibition results in a reduced absorption of fat. We can estimate that rat lingual lipase inhibition by BemPPOX decreased at least by 30% the FA absorption at the duodenal level, which corresponds to the full contribution of preduodenal/gastric lipase to fat digestion, estimated from digestion studies in patients with pancreatic lipase deficiency (Carrière et al., 2005). It is noteworthy that FA contents of intestinal tissue that does not reflect directly the rate of absorption because it also includes the mass of structural FAs (around 10 mg/g of duodenum). Since emulsions are rapidly digested by pancreatic lipase, it is not surprising that the major absorption occurred at the duodenal level and therefore that the major impact of preduodenal lipase inhibition by BemPPOX was observed at this level.

In the present study, the last issue was thus to determine if preduodenal lipase inhibition and subsequent decrease of the C8:0 gastric absorption influenced the plasma acylated (octanoylated) and unacylated ghrelin concentrations, after the action of the gastric GOAT enzyme in the stomach. On one hand, no effect of dietary trioctanoin and no effect of preduodenal lipase inhibition were observed on plasma acylated ghrelin concentrations after 30 and 120 min of digestion (**Figure 4.A** and **4.B**). It was unfortunately not possible to measure the ^{13}C -C8:0 attached to ghrelin. It is known that lipid digestion decreases ghrelin secretion from stomach and increases CCK and PYY secretion from intestine, in the short term (Degen et al., 2007). But the influence of the availability of dietary C8:0 in the gastric lumen and in gastric cells on the concentrations of circulating acylated ghrelin remains unclear. A recent study in ruminants showed that the ingestion of MCFAs during 2 weeks by lactating dairy cows increased the plasma acylated ghrelin concentrations (Fukumori et al., 2013). In cachectic patients, a 2-week administration of an enteral nutrition formula containing 3 g/day of octanoic acid enhanced plasma octanoylated ghrelin and also improved the body mass index (Ashitani et al., 2009). Conversely, in another study on the role of the

gustatory G-protein in the sensing of FAs for octanoylation of ghrelin, ingested MCFAs increased stomach acylated ghrelin but did not change the plasma acylated ghrelin concentration (Janssen et al., 2012). Similarly, we previously reported that no change in plasma acylated ghrelin concentration occurred in rats chronically fed with three dietary C8:0 levels (0, 8 and 21% of total FAs) during 6 weeks, in spite of the increased C8:0 availability (in fasted and fed rats) (Lemarié et al., 2015a).

On the other hand in the present study, plasma unacylated ghrelin concentrations and therefore total ghrelin concentration were significantly decreased in the Tri¹³C-C8:0 group after 30 min of digestion compared with the control groups. The inhibition of total ghrelin secretion induced by lipid digestion is stronger with dietary octanoic acid than with oleic acid, in the short term. This result regarding unacylated ghrelin is also consistent with our first nutritional study (Lemarié et al., 2015a) where a reproducible decrease in plasma unacylated ghrelin concentration was observed with trioctanoin chronic consumption. Plasma unacylated ghrelin concentrations were not altered by preduodenal lipase inhibition. Both lapses of time (30 and 120 min) might be too short considering the fact that plasma acylated ghrelin concentration rises before meal (Cummings et al., 2001) and that 15-days old rats' meal frequency is around 4-5 h. However, the basal concentration of acylated ghrelin (between two peaks) has been shown to be correlated with the energetic status and exerts a biological effect.

In the present study, the acylated and unacylated ghrelin concentrations in gastric tissues were not measured. Yet, the concentrations of plasma acylated and unacylated ghrelin may not simply reflect the stomach concentration (Goebel-Stengel et al., 2013; Nishi et al., 2005b). The maturation and secretion of stomach acylated ghrelin are complex processes potentially regulated by dietary LCFAs, MCFAs and G-protein coupled receptor 120 (GPR 120) (Gong et al., 2014); by deacylation under the action of acyl-protein thioesterase-1 (APT1) (Chen et al., 2014); and by degradation altered in the presence of proteins such as Ghrelin-reactive IgG (Takagi et al., 2013). In our study, a potential effect of the C8:0 availability on the gastric acylated ghrelin concentration, as observed in other studies (Fukumori et al., 2013), with a negative control of the ghrelin secretion in the plasma cannot be ruled out.

Conclusion

In this work, we used BemPPOX, a recently identified oxadiazolone-core inhibitor of preduodenal lipase to study the C8:0 release and absorption in the stomach and the effect on plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations in 15-days old suckling rats. The ¹³C-C8:0 gastric absorption from (1,1,1-¹³C)-Tri-C8:0 emulsion and its partial inhibition by BemPPOX were demonstrated and quantitatively estimated. However, trioctanoin consumption did not increase plasma acylated ghrelin concentration. Conversely, a decrease in unacylated ghrelin concentration was observed 30 min after Tri-C8:0 emulsion ingestion. Preduodenal lipase inhibition did not modify plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations. The effect of BemPPOX and Tri-C8:0 may however differ depending on age and may vary among species.

Acknowledgments

The authors are thankful to CNIEL (Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière, France) for constructive scientific discussion and financial support. The authors also thank N. Boulier-Monthéan for animal care.

Partie C

C. Étude préliminaire *in vitro* du métabolisme du C8:0 dans les cellules gastriques

La partie C présente l'approche préliminaire *in vitro* ayant pour objectif l'étude du métabolisme du C8:0 dans les cellules de l'estomac, comparé au métabolisme de cet acide gras dans les hépatocytes, afin de compléter les données *in vivo* des articles 1 et 2. Les modèles d'étude, les adaptations des méthodologies et les premiers résultats sont exposés ici.

C.1. Contexte et objectifs de l'étude

Le métabolisme des AGCM a déjà été bien décrit dans de nombreux tissus, notamment dans le muscle et le foie (Papamandjaris et al., 1998; Pégrier et al., 1988; Scheig et al., 1968). Les AGCM sont peu mis en réserve, contrairement aux AGCL, et sont fortement β -oxydés dans les mitochondries et ω -oxydés dans les microsomes. En revanche, il y a peu (voir pas) de données disponibles sur le captage des AGCM et leur métabolisme dans les cellules de l'estomac, *in vitro*. Or, nos études *in vivo* ont montré une absorption gastrique de l'acide octanoïque (Article 2) et un possible mécanisme de préservation de cet acide gras dans les cellules gastriques (Article 1).

Les objectifs de cette approche *in vitro* étaient donc de comparer le métabolisme du C8:0 dans les cellules de la muqueuse et dans les hépatocytes pour quantifier son captage, sa β -oxydation, son estérification dans les lipides cellulaires et son utilisation pour l'acylation de la ghréline. Pour cette étude, la culture primaire de cellules d'estomac de rats et la culture d'explants d'estomac ont été mises en place ; les cellules d'estomac ont été incubées avec des milieux contenant du C8:0 non marqué, du [1-¹³C]-C8:0, du [1-¹⁴C]-C8:0. Les compositions en acides gras et l'incorporation du carbone traceur dans les cellules ou les milieux de culture ont été analysés. Les cellules ont également été incubées avec de l'alcyne-C8:0 (triple liaison), qui mime le C8:0 pour détecter les protéines octanoylées (technique de click chemistry (Yap et al., 2010)), afin d'étudier la part de C8:0 qui acyle la ghréline, ou d'éventuelles autres protéines.

C.2. Matériels et méthodes

C.2.1. Animaux

Les animaux utilisés proviennent du centre d'élevage Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) et sont de race Sprague-Dawley (SD). Ils sont élevés sous environnement contrôlé dans l'animalerie du laboratoire de Biochimie et Nutrition Humaine, sur le site d'Agrocampus

Ouest. La température est maintenue à 22 ± 2 °C avec une hygrométrie de $50 \pm 10\%$ et un cycle jour/nuit de 12 h. Les rats sont nourris *ad libitum* avec un régime d'entretien M20 (Special Diet Services, Witham, Angleterre), les femelles allaitantes avec un régime de croissance M25 (Special Diet Services) ; tous possèdent un accès illimité à l'eau de boisson. Pour les perfusions de foie, les rats sont âgés de 6 à 7 semaines et pèsent environ 250 g. Les rats sont mis à jeun 12 h avant leur sacrifice. Le protocole de mise en culture des hépatocytes chez le rat (N°01305.01) a été approuvé par le comité d'éthique de Rennes et par le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche. Pour la culture primaire des cellules d'estomac de rats, les femelles allaitantes et les portées de rats sont reçues deux jours avant le sacrifice. Les rats sont sacrifiés à l'âge de 7 à 8 jours.

C.2.2. Cultures cellulaires

C.2.2.1. Culture d'hépatocytes de rat en culture primaire

Les hépatocytes sont obtenus par perfusion *in situ* de foie de rat, selon une méthode précédemment décrite (Seglen, 1976) et adaptée au laboratoire (Legrand, 1991). Le rat est anesthésié à dose létale d'Euthazol Vet (140mg/kg), par injection intrapéritonéale. L'héparine (500 UI/200 µL) est injectée dans la veine fémorale pour éviter une coagulation sanguine trop rapide. La cavité abdominale est ensuite ouverte, un cathéter est posé dans la veine porte en amont du foie. Celui-ci est lavé sous perfusé (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 1,28 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4) à 37°C pendant 10 min (30 mL/min), après avoir coupé la veine sus-hépatique. Le foie est ensuite traité à la collagénase IV (Sigma-Aldrich) à 0,125 g/L dans une solution de perfusé additionnée de CaCl₂·2H₂O à 0,6 g/L pendant 10 min (0,2 U/mL, 20 mL/min). Le foie digéré est prélevé et les cellules hépatiques sont libérées en condition stérile dans du milieu Williams'E (Sigma-Aldrich). Les cellules sont filtrées sur une membrane de nylon de porosité 60 µm ; la solution cellulaire ainsi obtenue est laissée à décanter pendant 20 min. Les cellules sont lavées trois fois dans du milieu de culture Williams'E, suivi de centrifugations (1 min, 200 g, 20°C). Le nombre d'hépatocytes et la viabilité des cellules sont estimés par un test d'exclusion au bleu de trypan à l'aide d'une cellule de Malassez. La viabilité doit être supérieure à 75% pour garantir une qualité suffisante de la culture primaire. Les cellules sontensemencées à hauteur de $1,6 \cdot 10^6$ cellules par boîte de culture de 30 mm de diamètre et $4,8 \cdot 10^6$ cellules par boîte de 100 mm de

diamètre. Le milieu de culture est le Williams'E additionné de 7% de sérum de veau fœtal (SVF, BioWhittaker™), d'antibiotiques (50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 10 µg/mL de gentamycine), de 1 µM d'insuline (Sigma-Aldrich) et de 1 µM de dexaméthasone (Sigma-Aldrich). Les hépatocytes sont cultivés dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère modifiée à 5% de CO₂ et saturée en humidité. Après 4 h de culture, le milieu d'ensemencement est remplacé par du milieu Williams'E sans SVF.

C.2.2.2. Culture primaire des cellules d'estomac de raton

La culture primaire de cellules d'estomac de rats a été mise au point au cours de mon doctorat (**Figure 23.A**). La méthode de mise en culture est adaptée de différents protocoles (Gagnon, 2012; Konda, 2002; Terano et al., 1982). La mise en culture a été testée avec des rats de différents âges, mais seules les cellules provenant d'estomacs de rats (4 à 15 jours) se sont suffisamment multipliées et ont montré une bonne viabilité. De plus, l'utilisation de rats nouveau-nés permet de limiter le développement des fibroblastes. Les rats de 8 jours sont sacrifiés par une injection létale d'Euthasol Vet (140 mg/kg). Les estomacs sont récupérés dans des boîtes de pétri placées sur de la glace et contenant une solution de HBSS (Hank's balanced salt solution) additionnée de 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Ils sont dégraissés, vidés et rincés quatre fois avec la solution de HBSS puis lacérés en petits morceaux dans un faible volume de HBSS, afin que les tissus ne sèchent pas. Une solution de lyse stérile (HBSS à 0,1% de collagénase Type IA et 0,05% de hyaluronidase) est ajoutée aux morceaux d'estomac et ceux-ci sont incubés à 37°C pendant 60 min, sous agitation. Les cellules gastriques sont dispersées par pipetage, puis incubées de nouveau 15 min à 37°C sous agitation. La solution est filtrée sur une membrane de nylon de porosité 200 µm et le filtrat est centrifugé (5 min, 1 000 g). Les cellules sont lavées deux fois dans du milieu de culture DMEM F-12, suivi de centrifugations (5 min, 200 g, 20°C). Les cellules sont ensemencées dans des boîtes Corning® Primaria™ (Dutscher) à une concentration de $1,6 \cdot 10^6$ cellules par boîte de culture de 30 mm de diamètre et $4,8 \cdot 10^6$ cellules par boîte de 100 mm de diamètre, dans du DMEM F-12 contenant 10% de FBS, 50 µL/500 mL de fibronectine, 100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 100 µg/mL de gentamycine. Les cellules d'estomac sont cultivées dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère modifiée à 5% de CO₂ et saturée en humidité. Lorsque les cellules sont

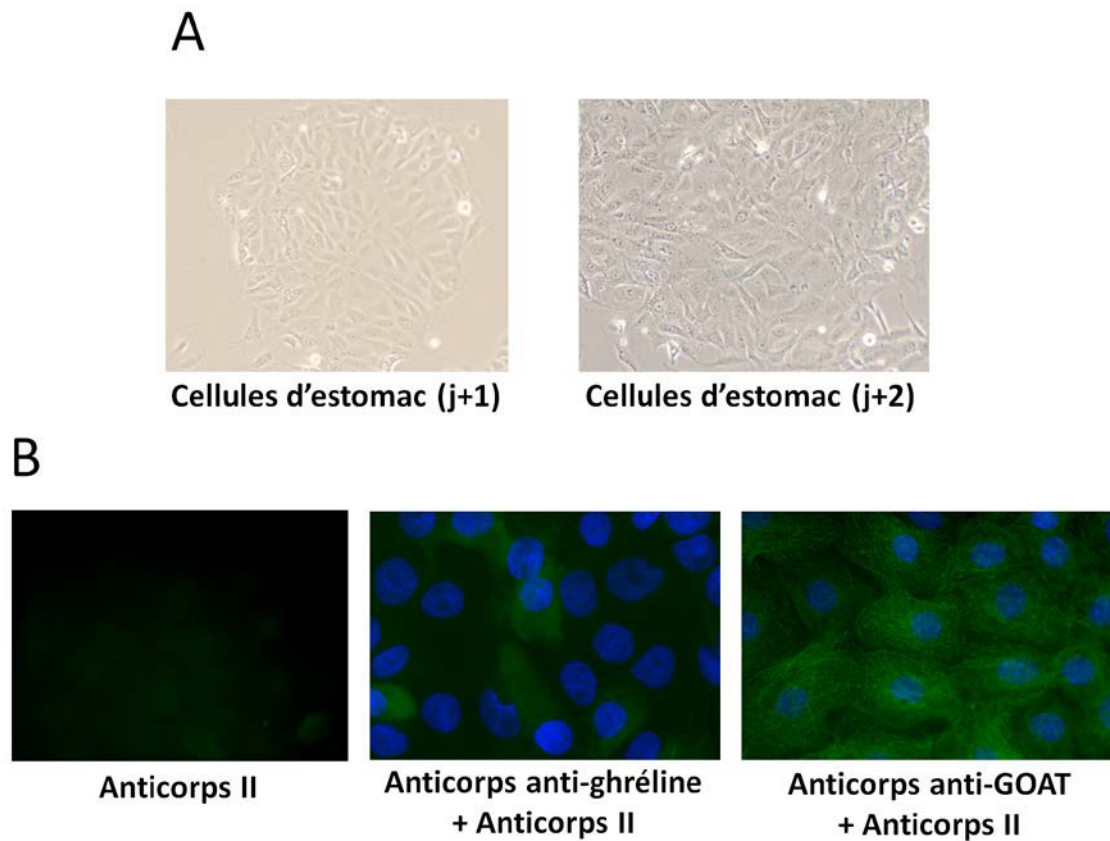


Figure 23. Culture primaire de cellules d'estomac de rats

A) Cellules d'estomac de rats 1 et 2 jours après la mise en culture ; **B)** Marquage par immunofluorescence : pas de marquage (anticorps secondaire seul) ; marquage de la ghréline et des noyaux ; marquage de la GOAT et des noyaux

adhérentes, soit 4 à 5 h après la mise en culture, le milieu de culture est changé. Le milieu de culture est ensuite changé quotidiennement.

Validation du modèle

L'estomac est composé de différents types de cellules : les cellules musculaires lisses, les cellules du mésenchyme, les cellules formant les vaisseaux sanguins, les cellules nerveuses, les cellules immunitaires et les cellules épithéliales. Les cellules épithéliales sont elles-mêmes subdivisées en au moins une dizaine de cellules différentes (§ 3.2.2.3.1). Notre objectif, en réalisant des cultures de cellules d'estomac, était de modéliser la muqueuse gastrique *in vitro* et donc, de cultiver des cellules épithéliales. Or, le protocole utilisé permet justement d'obtenir 90% de cellules épithéliales (Konda, 2002), les 10% restants étant essentiellement des fibroblastes et des cellules nerveuses, facilement reconnaissables en microscopie. La présence de ghréline et de GOAT a été contrôlée par immunofluorescence (**Figure 23.A**) et par dot blot (*données non incluses*) et a été confirmée.

C.2.2.3. Culture d'explants d'estomac de rat

La culture d'explants d'estomac de rats a été mise au point au cours de mon doctorat. Le protocole est adapté de méthodes de mise en culture d'explants d'estomac humain (Olfat et al., 2002) et d'estomac de rats (Tømmerås et al., 1997). Les rats sont sacrifiés par une injection létale d'Euthasol Vet (140 mg/kg). Les estomacs sont récupérés dans des boîtes de pétri contenant du tampon phosphate salin (PBS) stérile, placées sur de la glace. Ils sont dégraissés, ouverts, vidés et rincés trois fois au PBS stérile. Les estomacs sont ensuite séparés en fundus, corpus et antrum ; chaque partie est rincée plusieurs fois avec du PBS stérile, afin d'éliminer toutes traces du bol alimentaire. A l'aide d'un punch à biopsie 2 mm (Dutscher), des explants de fundus, corpus et antrum sont obtenus, rincés avec du DMEM et placés dans des plaques de culture 6 puits (STARLAB) contenant du DMEM additionné de 10% de SVF, 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 10 µg/mL de gentamycine. Les explants d'estomac sont cultivés dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère modifiée à 5% de CO₂ et saturée en humidité. Le milieu est changé 1 h après la mise en culture.

C.2.3. Incubations des cellules (hépatocytes, cellules et explants d'estomac) avec des acides gras

C.2.3.1. Préparation des complexes albuminiques d'acides gras

○ Principe général de la complexation

Les acides gras sont des molécules hydrophobes et par conséquent, ils doivent être complexés à l'albumine pour se solubiliser dans le milieu de culture (Rioux et al., 2000). Différents ratios acides gras/albumine ont été testés ici, allant de 100 $\mu\text{M}/150 \mu\text{M}$ à 500 $\mu\text{M}/150 \mu\text{M}$, sachant que la concentration plasmatique moyenne en acides gras liés à l'albumine, chez l'Homme au repos, équivaut à 500 μM . Au-dessus, les doses ne sont plus considérées comme physiologiques. Les acides gras sont saponifiés en présence de NaOH à 0,5 M dans du méthanol à 70°C pendant 30 min. Après évaporation sous flux d'azote, les sels d'acides gras formés (AG^- , Na^+) sont dissous dans du milieu de culture contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Fraction V, Sigma-Aldrich). Les sels d'acides gras sont ensuite complexés à la BSA par agitation mécanique, après ajustement du pH à 10, pendant 12 h à température ambiante. Le pH de la solution est réajusté à 7,4, puis le milieu est stérilisé par filtration sur une membrane de porosité 0,2 μm et additionné d'antibiotiques (50 UI/mL de pénicilline, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine et 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamycine). Un échantillon de chaque milieu complexé est conservé, pour analyser la teneur et la composition en acides gras.

Les acides gras utilisés sont le C8:0, le C12:0, le C14:0 et le C16:0 non marqués, marqués au carbone 13 ou 14, ou portant une fonction ω -alcyne. Les acides gras radiomarqués au carbone 14 ($[1-^{14}\text{C}]\text{-C8:0}$, $[1-^{14}\text{C}]\text{-C14:0}$, Isobio, Belgique), sont dilués avec l'acide gras non radioactif correspondant afin d'obtenir la radioactivité spécifique et la concentration désirées (en général 183,3 MBq/mmol et 100 μM).

○ Cas particulier des AGCM

Étudier les AGCM entraîne des difficultés méthodologiques, ces acides gras étant plus volatiles que les AGCL, surtout lorsqu'ils sont chauffés. Cela pose des problèmes pour la préparation des complexes albuminiques de C8:0 (phase d'évaporation sous flux d'azote) et également pour l'extraction des acides gras. Différents protocoles de préparation des milieux

enrichis en acide octanoïque ont été testés : 1) protocole classique de complexation, 2) protocole classique de complexation avec évaporation à froid (sur glace) des sels d'acide octanoïque, 3) C8:0 en solution alcoolique (100 mg AG/mL éthanol) ajouté directement dans un milieu à 1% de BSA (éthanol : milieu de culture < 1:2500 (v/v)).

C.2.3.2. Préparation de milieux contenant des acides gras non complexés à l'albumine

Les AGCM étant relativement solubles en solution aqueuse (si la [C8:0] < 500 µM) comparés aux AGCL, des milieux de culture sans BSA avec de l'acide octanoïque (en solution alcoolique ; 100 mg AG/mL éthanol) non saponifié ont aussi été préparés.

C.2.3.3. Incubation

Les cellules gastriques sont utilisées à 48 h de culture, les hépatocytes à 24 h de culture et les explants à 1 h de culture. Avant chaque incubation, le milieu de culture en place est éliminé. L'incubation débute au moment de l'ajout, dans chaque boîte de culture de milieu contenant les acides gras, radiomarqués ou non, complexés à l'albumine. Les cellules sont incubées (37°C, 5% de CO₂) pendant des temps variables.

C.2.3.4. Collecte des cellules et des milieux de culture

Les milieux de culture des cellules ou d'explants sont collectés et centrifugés afin d'éliminer les débris cellulaires (500 g, 5 min, 4°C), puis le surnageant est congelé à -20°C. Les hépatocytes et les cellules gastriques sont collectées par grattage, dans du PBS, et centrifugées (500 g, 5 min, 4°C). Les culots cellulaires sont lavés deux fois dans du PBS puis repris dans du tampon PBS ou RIPA (Radio-immunoprecipitation assay). Les cellules sont ensuite lysées par sonication aux ultrasons. Les explants sont récupérés, rincés au PBS et sont instantanément congelés dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C.

C.2.3.5. Dosage des protéines totales

Les concentrations protéiques des échantillons sont mesurées par un dosage colorimétrique (à λ=595 nm) adapté de la méthode de Bradford (1976), en utilisant le réactif Protein Assay (Bio-Rad). Les concentrations protéiques sont estimées par comparaison à une gamme de BSA à 1 mg/mL.

C.2.4. Mesure de l'incorporation des acides gras (radiomarqués ou non) dans les cellules, les lipides et les produits de β -oxydation

C.2.4.1. Extraction des lipides

○ Acides gras non radiomarqués ou marqués au carbone 13

Les lipides totaux (LT) des cellules et des milieux sont extraits par un mélange d'hexane/isopropanol (3:2, v/v), après acidification par ajout d'1 mL de HCl 3 M. Le C5:0, le C7:0 et le C17:0 sont ajoutés comme standards internes pour quantifier les masses d'AGCM et d'AGCL. Les étapes d'évaporation se font en déposant les LT sur des plaques de silice, pour éviter la perte des AGCM volatiles. Les acides gras collectés sont ensuite transméthylés en présence de 2 mL de H₂SO₄ dans du méthanol (1:10, v/v), à 70°C pendant 30 min. Les esters méthyliques d'acides gras (FAMES) sont extraits en ajoutant 0,5 mL d'hexane et 8 mL de NaCl 0,9%. L'analyse de la phase hexane est faite par GC-MS, comme décrit dans l'article 2.

○ Acides gras radiomarqués au carbone 14

L'analyse des acides gras radiomarqués a été réalisée selon une méthode déjà décrite (Rioux et al., 1999) consistant à transformer les acides gras présents dans les lipides totaux en esters naphthacyliques d'acides gras et à séparer ces derniers par HPLC.

C.2.4.2. Mesure de la radioactivité incorporée dans les produits de β -oxydation

○ Mesure de la production de ¹⁴CO₂

La mesure de la production de ¹⁴CO₂ est réalisée selon une méthode déjà décrite (Guillot et al., 1997). Après incubation des hépatocytes avec un acide gras radiomarqué, le contenu d'une boîte de culture (milieu d'incubation et cellules collectées par grattage) est transféré dans un erlenmeyer contenant 250 μ L de HClO₄ 70% (v/v). L'erlenmeyer est alors rapidement obturé de manière étanche par un bouchon à jupe rabattable en caoutchouc. Pour piéger le CO₂ libéré à la suite de l'acidification du milieu, 350 μ L d'hydroxyde d'hyamine (1 M dans le méthanol) sont déposés, en perçant le bouchon à l'aide d'une seringue, dans un réservoir suspendu au centre de l'erlenmeyer. Le CO₂ est piégé au cours d'une incubation de 2 h à 37 °C sous agitation, puis précipité en mélangeant le contenu du réservoir central avec 20 mL de baryte N/10 et 2,5 mL de Na₂CO₃ 0,1 M qui sert de « carrier ». Le précipité est filtré puis lavé

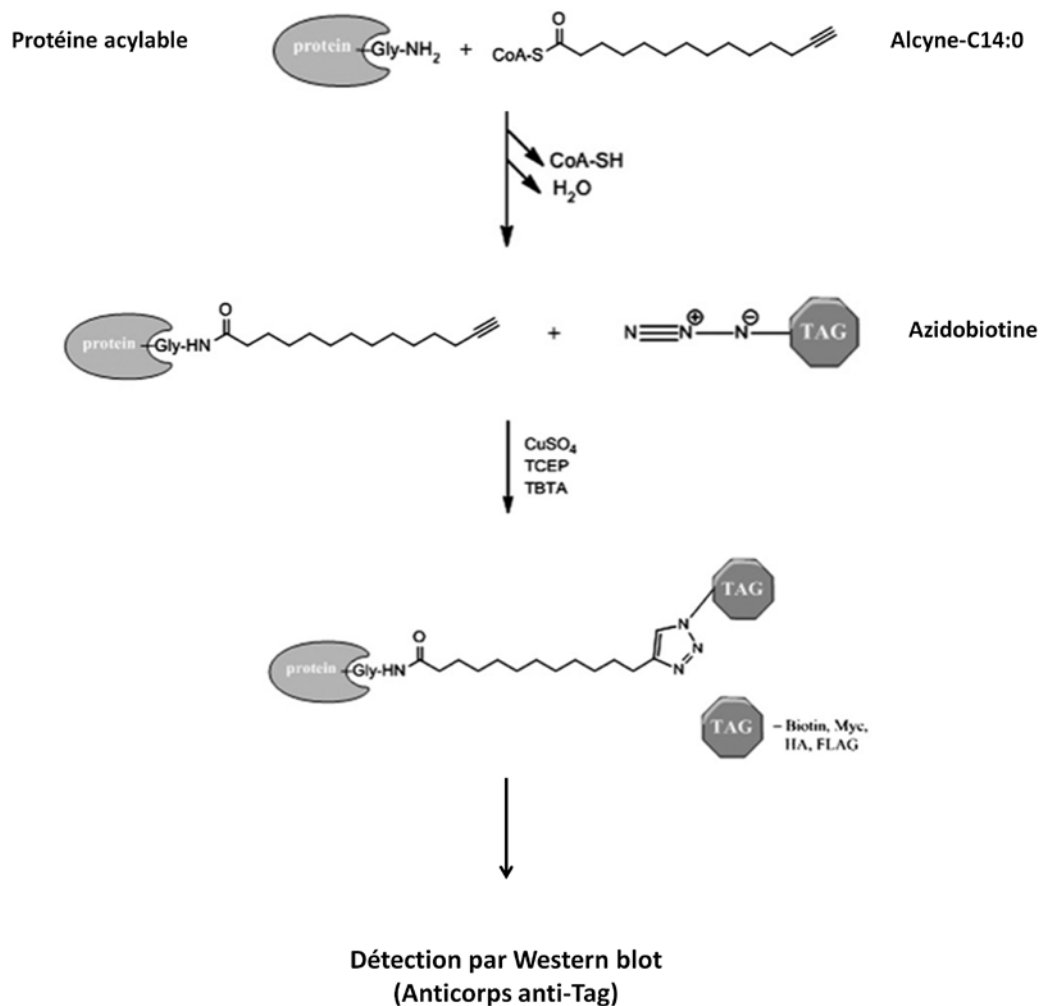


Figure 24. Principe de la click Chemistry (exemple avec de l'alcyne-C14:0)

Les cellules sont incubées avec un acide gras portant une fonction ω -alcyne (ici l'alcyne-C14:0) utilisable par les acyltransférases. Le lysat cellulaire est collecté et les protéines acylées sont marquées avec de l'azido-biotine par réaction de click chemistry, ou azido/alcyne cyclo-addition de Huisgen en catalyse cuivrique. La haute réactivité de la fonction alcyne permet le marquage (ici, avec de la biotine) puis la détection des protéines acylées en Western blot.

successivement par 10 mL d'eau, d'éthanol et d'acétone. Le filtre contenant le précipité est séché et introduit directement dans un pot de comptage, additionné de 10 mL de scintillant pour milieu organique (Ultima Gold™, Perkin Elmer). Pour chaque culture cellulaire, les mesures sont réalisées en double, déduction faite d'un témoin qui ne contient pas de radioactivité.

- **Mesure de la production de métabolites acido-solubles radioactifs**

La radioactivité incorporée dans les métabolites acido-solubles a été mesurée selon la méthode décrite par Mannaerts *et al.* (1979). Le contenu d'une boîte de culture (milieu d'incubation et cellules) est transféré dans un tube de centrifugation contenant 250 µL de HClO₄ 70% (v/v) et placé pendant 15 min dans la glace. Après centrifugation (10 min, 3 000 g, 4°C), la totalité du surnageant est récupérée et lavée trois fois par 2 mL d'hexane, pour éliminer les traces éventuelles d'acides gras radioactifs dans la phase aqueuse. Un mL de la solution lavée est alors transféré dans un pot de comptage additionné de scintillant pour milieu aqueux. Les résultats obtenus en dpm sont ensuite exprimés par boîte de culture. Pour chaque culture cellulaire, les mesures sont réalisées en double, déduction faite d'un témoin réalisé pour chaque acide gras précurseur, par précipitation de 2 mL du milieu d'incubation initial, sans contact avec les cellules, afin d'apprécier l'efficacité des lavages à l'hexane.

C.2.5. Click chemistry ou azido/alcyne cyclo-addition de Huisgen, en catalyse cuivrique

La technique de click chemistry (ou azido/alcyne cyclo-addition de Huisgen en catalyse cuivrique) permet de détecter des protéines acylées (**Figure 24**) (Yap et al., 2010), en incubant des cellules avec un acide gras portant une fonction ω-alcyne, utilisable par les acyltransférases. La haute réactivité de la fonction alcyne permet le marquage (ici, avec de la biotine) puis la détection des protéines acylées.

C.2.5.1. Synthèse de l'alcyne-C8:0

La synthèse de l'alcyne-C8:0 a été réalisée au laboratoire (**Figure 25.A**). Dans un ballon de 50 mL à fond rond, 2 g (21,3 mmol) de complexe acétylure de lithium-EDA (éthylènediamine) et 4,6 mL de DMSO sont lentement refroidis dans la glace jusqu'à ce que la température du mélange atteigne 0 °C. Puis 1,4 g (7,1 mmol) d'acide 6-bromocaproïque

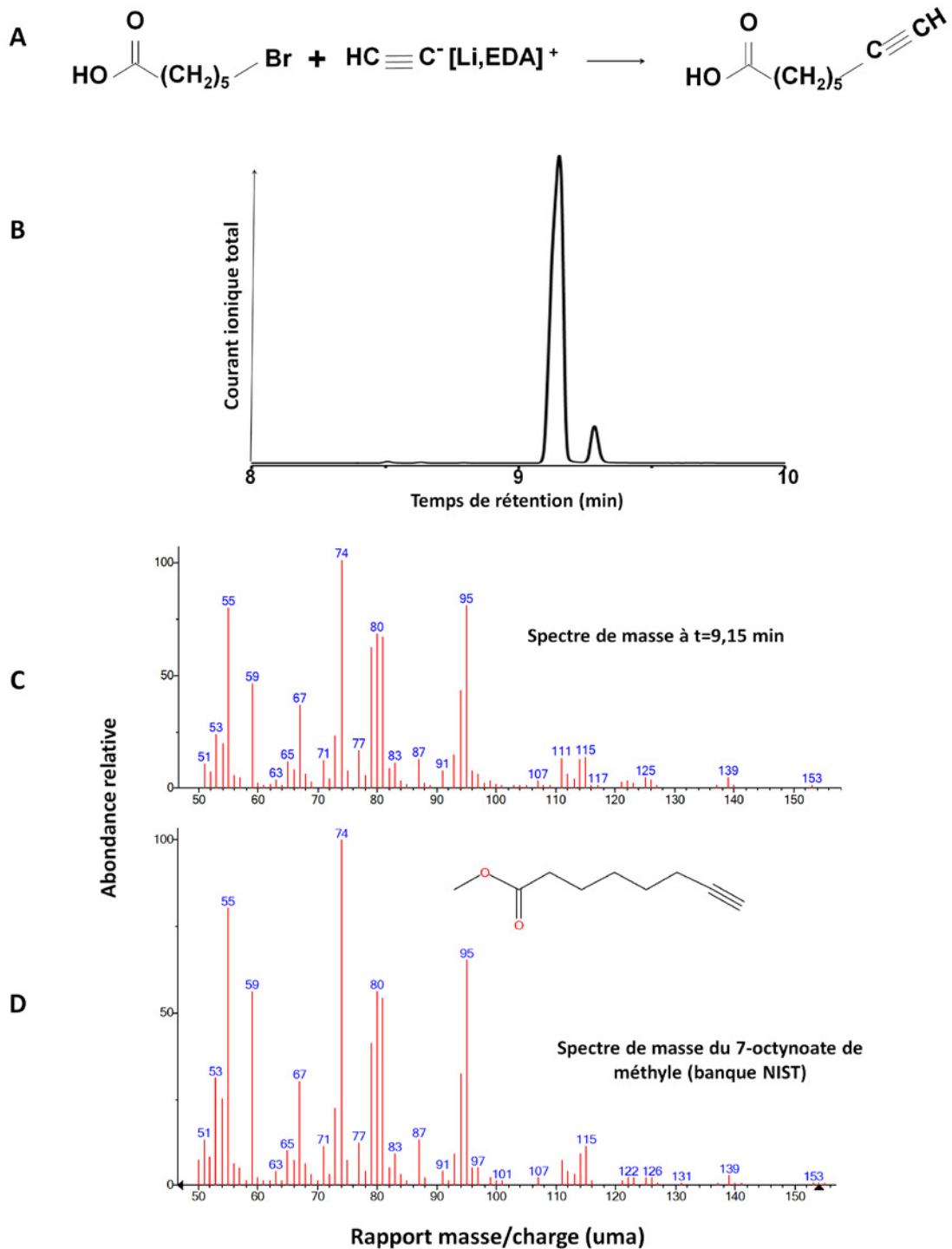


Figure 25. Synthèse de l'alcyne-C8:0 et caractérisation en GC-MS de la molécule obtenue

A) Voie de synthèse de l'alcyne-C8:0 ; B) Chromatographe du produit final de la réaction ; C) spectre de masse du pic obtenu à t=9,15 min, comparé au spectre de masse attendu de l'alcyne-C8:0 (ester méthylique).

dans 6,2 mL de DMSO sont ajoutés dans le ballon. Après 10 min, le bain de glace est retiré et la solution est laissée à température ambiante. Après 2 h, le mélange réactionnel est versé dans 100 mL d'eau salée (NaCl 9‰) glacée, acidifié avec du HCl 1 N et les produits de réaction sont extraits au CH₂Cl₂. La phase organique est séchée au Na₂SO₄, le solvant est évaporé sous vide. Après méthylation, la pureté de l'alcyne-C8:0 ainsi obtenu est contrôlée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (**Figure 25.B**). La pureté de l'alcyne-C8:0 est de 93%, il est conservé à -80°C.

Les alcynes-C14:0 et C16:0 ont été fournis par le laboratoire de Luc Berthiaume (Département de biologie cellulaire, Université d'Alberta, Edmonton, Canada).

C.2.5.2. Préparation des milieux contenant les alcynes

Les milieux de culture contenant les complexes albuminiques d'acides gras portant la fonction alcyne sont préparés classiquement, comme pour les acides gras standards. La concentration finale en alcyne dans le milieu de culture est de 20 µM et la BSA utilisée est délipidée. Pour éviter l'étape d'évaporation après la saponification qui peut entraîner une perte partielle de l'alcyne-C8:0, des milieux complexés avec les acides gras non saponifiés ont également été préparés.

C.2.5.3. Incubation des cellules avec les milieux contenant les alcynes

Le milieu de culture des cellules est aspiré et remplacé par du DMEM-F12 sans SVF additionné de 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 10 µg/mL de gentamycine (étape de délipidation). Les cellules sont ensuite incubées pendant 1 h avec les solutions contenant l'alcyne-C8:0, l'alcyne-C14:0 ou l'alcyne-C16:0.

C.2.5.4. Collecte des cellules

Le milieu de culture est prélevé et les cellules (HeLa ou cellules d'estomac de rats) sont récupérées et lavées deux fois au PBS, suivi de centrifugation (5 min, 200 g, 4 °C). Le culot cellulaire est repris dans du tampon RIPA sans EDTA (150 mM NaCl ; 1% IGEPAL[®] CA-630, 0,5% sodium deoxycholate, 2 mM MgCl₂, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0), mis à agiter pendant 20 min à 4 °C, puis centrifugé (10 min, 16 100 g, 4 °C). Le surnageant est conservé et la concentration en protéines est évaluée par un dosage de Bradford.

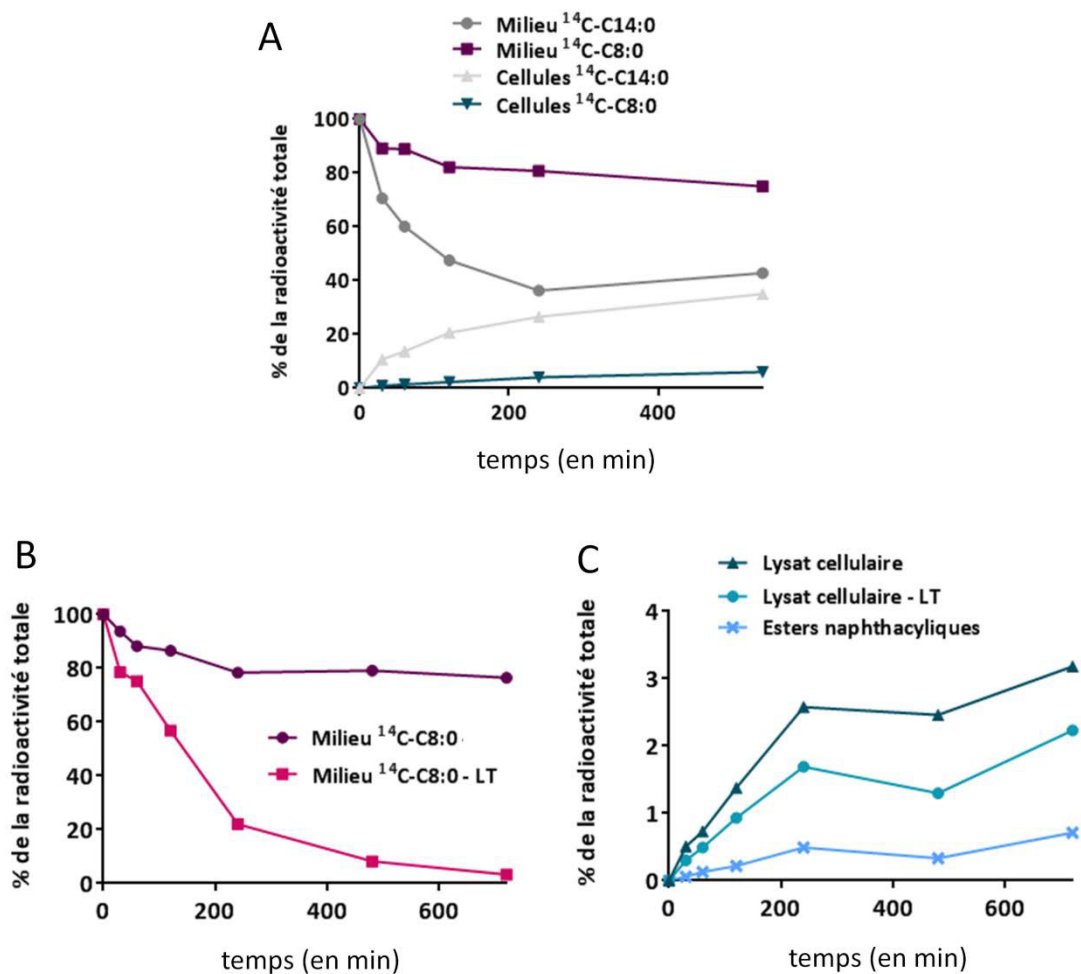


Figure 26. Mesure de la radioactivité dans les milieux de culture et les lysats cellulaires d'hépatocytes après incubation avec des complexes albuminiques de $[1-^{14}\text{C}]$ -C14:0 ou de $[1-^{14}\text{C}]$ -C8:0 (à 100 μM , BSA, Fraction V)

A) Radioactivité (exprimée en % de la radioactivité totale) mesurée dans les milieux de culture (complexes albuminiques de $[1-^{14}\text{C}]$ -C14:0 ou de $[1-^{14}\text{C}]$ -C8:0, avec BSA non délipidée) et dans les hépatocytes ; **B)** radioactivité (exprimée en % de la radioactivité totale) mesurée dans le milieu $[1-^{14}\text{C}]$ -C8:0 après incubation avec les hépatocytes, avant et après extraction des lipides totaux ; **C)** radioactivité mesurée dans le lysat cellulaire des hépatocytes incubés avec le milieu $[1-^{14}\text{C}]$ -C8:0, avant et après extraction des lipides totaux et des esters naphthacyliques. Les résultats présentés dans le graphique A ne sont pas issus de la même expérimentation que les résultats des graphiques B et C.

C.2.5.5. Incubation avec des billes de NeutrAvidine

Cette étape a été ajoutée afin d'éliminer une partie des protéines naturellement biotinyllées, présentes dans l'échantillon. Environ 100 µg de protéines sont prélevées et incubées avec des billes de NeutrAvidine dans du tampon RIPA pendant 4 h à 4°C. L'échantillon est centrifugé, le surnageant prélevé et les protéines dosées une nouvelle fois.

C.2.5.6. Réaction de click chemistry

La réaction de click chemistry consiste en l'addition d'azido-biotine (**Figure 24**) sur la fonction alcyne des acides gras liés aux protéines acylables. Une quantité définie de protéines (30 à 100 µg) est prélevée dans l'échantillon et complétée avec du tampon RIPA à 0,1% SDS pour atteindre un volume final de 30 µL. L'échantillon est additionné de 100 µM de TBTA (Tris-(Benzyltriazolylmethyl) amine, Sigma-Aldrich), 1mM de CuSO₄, 1mM de mM Tris-carboxyethylphosphine (TCEP, Sigma-Aldrich) puis 100 µM d'azido-biotine (en respectant cet ordre) et incubé à l'obscurité pendant 30 min. La réaction est stoppée par ajout de 10 volumes d'acétone et les protéines sont précipitées pendant 1 h à -20°C. L'échantillon est centrifugé (15 min, 16 100 g, 4°C). Le culot protéique est repris dans du tampon 1% SDS et 50 mM HEPES, additionné de tampon Laemli (glycérol 40%, β-mercaptoéthanol 20%, SDS 8%, bleu de bromophénol 0,02%, Tris/HCl 0,25 M, pH 6,8) et dénaturé à 95°C , pendant 5 min. Les protéines marquées à la biotine sont séparées selon leur poids moléculaire sur des gels tris-tricine (BioRad) par une électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) et détectées par la NeutrAvidineTM-HRP (1:50 000 ; Pierce Biotechnology, Rockford, USA) et la membrane développée par le système ECL Plus (GE Healthcare), sur film radiographique.

Un traitement supplémentaire de la membrane avec 0,2 M de KOH, qui entraîne la rupture des liaisons esters et thioesters, permet de s'assurer de la spécificité des bandes observées en comparaison d'une membrane sans traitement KOH.

C.2.6. Immunofluorescence

Le milieu des cellules cultivées sur une lamelle de verre est aspiré et les noyaux sont marqués au Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Les cellules sont rincées au PBS froid puis

Tableau 14. Estimation de la β -oxydation dans les hépatocytes par mesure du $^{14}\text{CO}_2$ et des métabolites acido-solubles formés pendant 4 h d'incubation avec des complexes albuminiques de $[1-^{14}\text{C}]\text{-C8:0}$

radioactivité
(en % de la radioactivité initiale, après 4 h d'incubation)

$[1-^{14}\text{C}]\text{-acide gras}$	$^{14}\text{CO}_2$ (a)	Métabolites acido-solubles (b)	Total (a+b)
C8:0	1,4 \pm 0,1	47,6 \pm 2,6	49,0 \pm 2,7
C12:0	0,5 \pm 0,1	38,2 \pm 4,5	38,7 \pm 4,4
C14:0	0,4 \pm 0,1	14,5 \pm 2,0	14,9 \pm 2,2
C16:0	0,1 \pm 0,0	2,2 \pm 0,6	2,3 \pm 0,6

Les valeurs présentées pour les $[1-^{14}\text{C}]\text{-C12:0}$, -C14:0 et C16:0 sont présentées à titre de comparaison, et son issues d'expériences réalisées antérieurement

fixées dans du PBS additionné de 4% de paraformaldéhyde. Les cellules sont de nouveau rincées au PBS froid puis perméabilisées et saturées aspécifiquement au PBS à 1% de BSA et 0,2% de Triton 100X. Les cellules sont lavées rapidement 3 fois par du PBS à 1% de BSA et incubées avec l'anticorps primaire (anti-ghréline (totale) ou anti-GOAT). Les cellules sont rincées puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor® 488 (fluorochrome vert) dilué au 1/1000 dans du PBS à 1% de BSA et 0,2% de Triton 100X puis rincées de nouveau. La lamelle de verre sur laquelle se trouvent les cellules est rincée, séchée, déposée sur une lame de verre dans une goutte de solution de montage DABCO (DABCO 22,3% (*m/v*) et glycérol 10% (*v/v*) dans du PBS, pH 8.6), lutée au vernis incolore et conservée à -4°C. L'observation des lames est réalisée avec un microscope à épifluorescence DMRXA (Leica, Wetzlar, Allemagne) à l'aide d'un objectif à immersion (x100) et photographiée avec une camera CCD (Plate-forme microscopie MRic-ALMF, Rennes, France). Le logiciel utilisé pour l'analyse des images est Metavue (Molecular Devices, Silicon Valley USA).

C.2. Résultats

C.2.1. Métabolisme du C8:0 dans les cellules d'estomac, comparé au métabolisme du C8:0 dans les hépatocytes

- Métabolisme du C8:0 dans les hépatocytes

L'incubation d'hépatocytes avec des complexes albuminiques de [1-¹⁴C]-C8:0, en comparaison complexes albuminiques de [1-¹⁴C]-C14:0 pendant 540 min (**Figure 26.A**), entraîne une diminution de 20% de la radioactivité initiale (Rad_i) dans le milieu de culture, contre une baisse de 60% Rad_i pour le milieu contenant de le C14:0. La mesure de la radioactivité dans les lipides totaux (LT) extraits du milieu de culture [1-¹⁴C]-C8:0 montre une forte diminution avec le temps (**Figure 26.B**) : après 120 min d'incubation, seulement 50% Rad_i mesurée dans le milieu est sous forme de lipides et cette valeur chute à 1% Rad_i après 700 min. Dans les hépatocytes incubées 540 min avec du [1-¹⁴C]-C8:0 (**Figure 26.A**), 3% Rad_i est mesurée dans le lysat cellulaire, contre 20% dans les cellules incubées avec le [1-¹⁴C]-C14:0. Après extraction des LT dans les hépatocytes incubés avec le C8:0 (**Figure 26.C**), la radioactivité mesurée est équivalente à 2% Rad_i et 0,5% Rad_i dans les acides gras, sous forme d'esters naphthacyliques (Rioux et al., 1999). La mesure du ¹⁴CO₂ et des ¹⁴C-

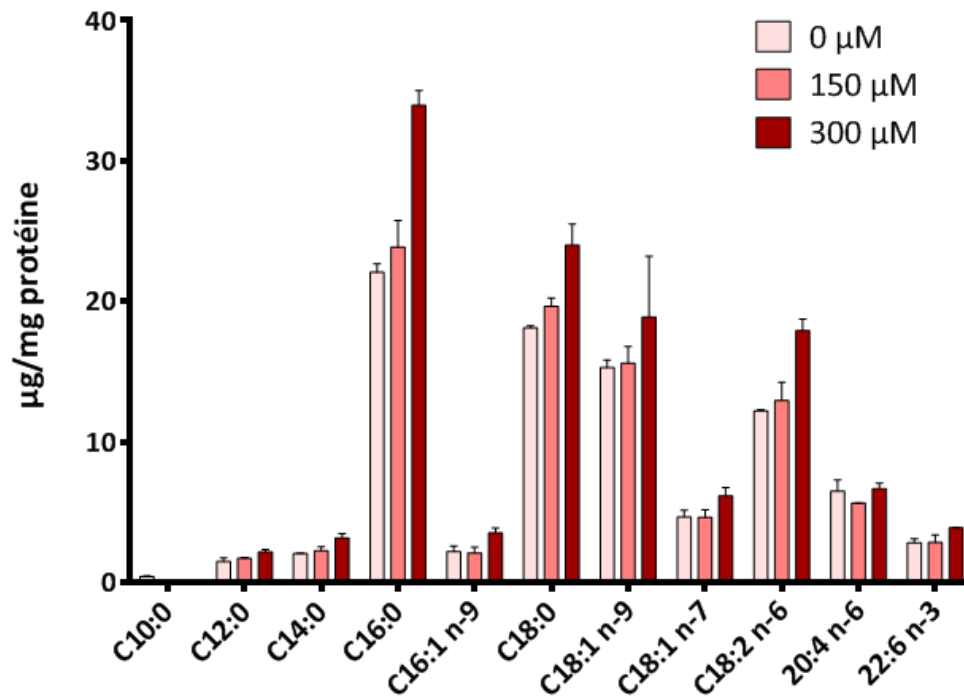


Figure 27. Incubation d'hépatocytes avec des milieux contenant des complexes albuminiques de C8:0 (à 0, 150 et 300 μM , BSA délipidée), pendant 4 h (n=2)

Les résultats sont exprimés en μg d'acide gras/mg de protéine \pm écart-type

métabolites acido-solubles (corps cétoniques et intermédiaires du cycle de Krebs) formés pendant l'incubation d'hépatocytes avec des complexes albuminiques de [1-¹⁴C]-C8:0 (100 µM final) (**Tableau 14**) confirme qu'environ 50% du [1-¹⁴C]-C8:0 initial est β-oxydé, après 4h.

Des expérimentations d'incubation des hépatocytes avec des acides gras marqués au carbone 13 ont été réalisées, après mise au point d'un protocole d'extraction adapté aux AGCM. Les cellules ont été incubées pendant 12 h avec un milieu contenant de la BSA standard ou des complexes albuminiques de [1-¹³C]-C8:0, [1-¹³C]-C12:0, [1-¹³C]-C14:0 et [1-¹³C]-C16:0. Ces expérimentations ont permis de constater la présence de C8:0 (non marqué au carbone 13) dans tous les milieux, y compris le milieu témoin contenant uniquement la BSA, faussant la qualité du témoin négatif (*résultats non inclus*). Après vérification, il est apparu que la BSA standard (Fraction V), classiquement utilisée, contient une quantité encore très importante d'acide octanoïque non estérifié. Le choix a donc été fait d'utiliser de la BSA délipidée (Merck Millipore), de meilleure qualité, qui contient également du C8:0, mais en quantité moindre par rapport à la BSA standard. Les 1^{ers} tests d'incubation des hépatocytes avec un milieu contenant de la BSA délipidée et du C8:0 (0, 150 et 300 µM) pendant 4 h suivi de l'analyse de la composition en acides gras (**Figure 27**) montrent une augmentation de la masse (en mg/g de protéine) de différents acides gras (C14:0, C16:0, C16:1 n-9, C18:0 et aussi C18:2 n-6), lorsque le C8:0 augmente dans le milieu. L'utilisation du C8:0 dans le milieu est quasi-totale (*donnée non incluses*), mais il n'y a pas de C8:0 mesuré dans les cellules (ce qui suggère une β-oxydation intense).

- **Métabolisme du C8:0 dans la muqueuse gastrique**

L'étude du métabolisme du C8:0 dans les cellules gastriques nécessitait la mise en place d'un modèle d'étude adapté, permettant de mesurer le captage, la β-oxydation et le stockage de cet acide gras. La culture primaire des cellules d'estomac de rats a donc été mise en place, mais le protocole initial ne permettait pas l'obtention d'un nombre suffisant de cellules. De plus, ce protocole ne permettait pas de favoriser le développement des cellules de la muqueuse. De nombreuses adaptations méthodologiques ont donc été réalisées (cf. section matériels et méthodes). Après ces mises au point, l'incubation des cellules gastriques avec des

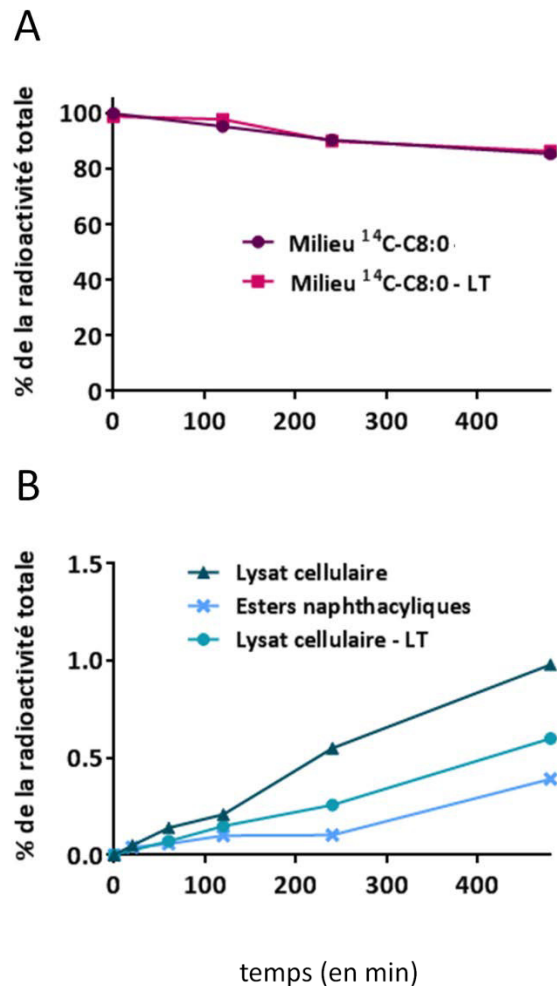


Figure 28. Mesures de la radioactivité dans les milieux de culture et les lysats cellulaires de cellules gastriques après incubation avec des complexes albuminiques de $[1-^{14}\text{C}]\text{-C8:0}$ (à $100\ \mu\text{M}$, BSA délipidée)

A) Radioactivité (exprimée en % de la radioactivité totale) mesurée dans le milieu $[1-^{14}\text{C}]\text{-C8:0}$ après incubation avec les cellules gastriques, avant et après extraction des lipides totaux ; **B)** radioactivité mesurée dans le lysat cellulaire des cellules gastriques incubées avec le milieu $[1-^{14}\text{C}]\text{-C8:0}$, avant et après extraction des lipides totaux et des esters naphthacyliques.

complexes albuminiques de [1-¹⁴C]-C8:0 (BSA délipidée, 100 µM) montre une faible baisse de la radioactivité dans le milieu équivalente à 10% Rad_i au bout de 4 h et 15% Rad_i après 8 h (**Figure 28.A**). Presque toute la radioactivité présente dans le milieu se trouve dans les lipides. Après 8 h d'incubation, seulement 1% de la radioactivité est retrouvée dans le lysat cellulaire dont environ 0,5% dans les lipides totaux et 0,3% dans les esters naphthacyliques d'acides gras (**Figure 28.B**). Ce résultat montre donc un très faible captage du C8:0 par les cellules d'estomac en culture.

Supposant que le faible captage de l'acide octanoïque pouvait être lié au modèle d'étude, trop éloigné de la structure de la muqueuse gastrique, des expériences d'incubation d'acides gras ont été réalisées avec des explants d'estomac de rat. Quel que soit l'âge des rats (8, 15, 21 jours ou 2 mois), le temps d'incubation (0 à 10 h), la concentration en complexe albuminique de C8:0 dans le milieu (0, 100, 150, 250, 300 et 500 µM), l'incubation d'explants de fundus, de corpus et d'antrum avec du C8:0 (radiomarqué ou non) n'a pas permis l'incorporation du C8:0 ou une diminution significative de cet acide gras dans le milieu de culture (*données non incluses*). Il n'y a pas non plus eu d'effet sur la composition des autres acides gras dans les explants.

C.2.2. Utilisation du C8:0 pour l'acylation de la ghréline dans les cellules d'estomac en culture primaire

La technique de click chemistry permet de marquer une protéine acylable avec un acide gras portant une fonction ω-alkyne, puis de marquer cette fonction (dans notre cas avec de l'azido-biotine) (**Figure 24**), pour la détecter en Western blot avec un anticorps dirigé contre la biotine. Cette technique a permis de mettre en évidence des protéines palmitoylées (Yap et al., 2010) et myristoylées (Colquhoun et al., 2015). Les alkyne-C14:0 et -C16:0 sont disponibles commercialement (Thermo Fischer, Click-iT®), contrairement à l'alkyne-C8:0 qui a donc dû être synthétisé au laboratoire.

L'étude de l'octanoylation de la ghréline par l'alkyne-C8:0 a présenté plusieurs difficultés. Tout d'abord, le nombre de cellules gastriques obtenues et, par conséquent, la quantité de protéines étaient initialement trop faible pour la détection de protéines acylées faiblement exprimées dans les cellules (ce qui est le cas de la ghréline, chez des ratons (§3.2.2.3.). Le

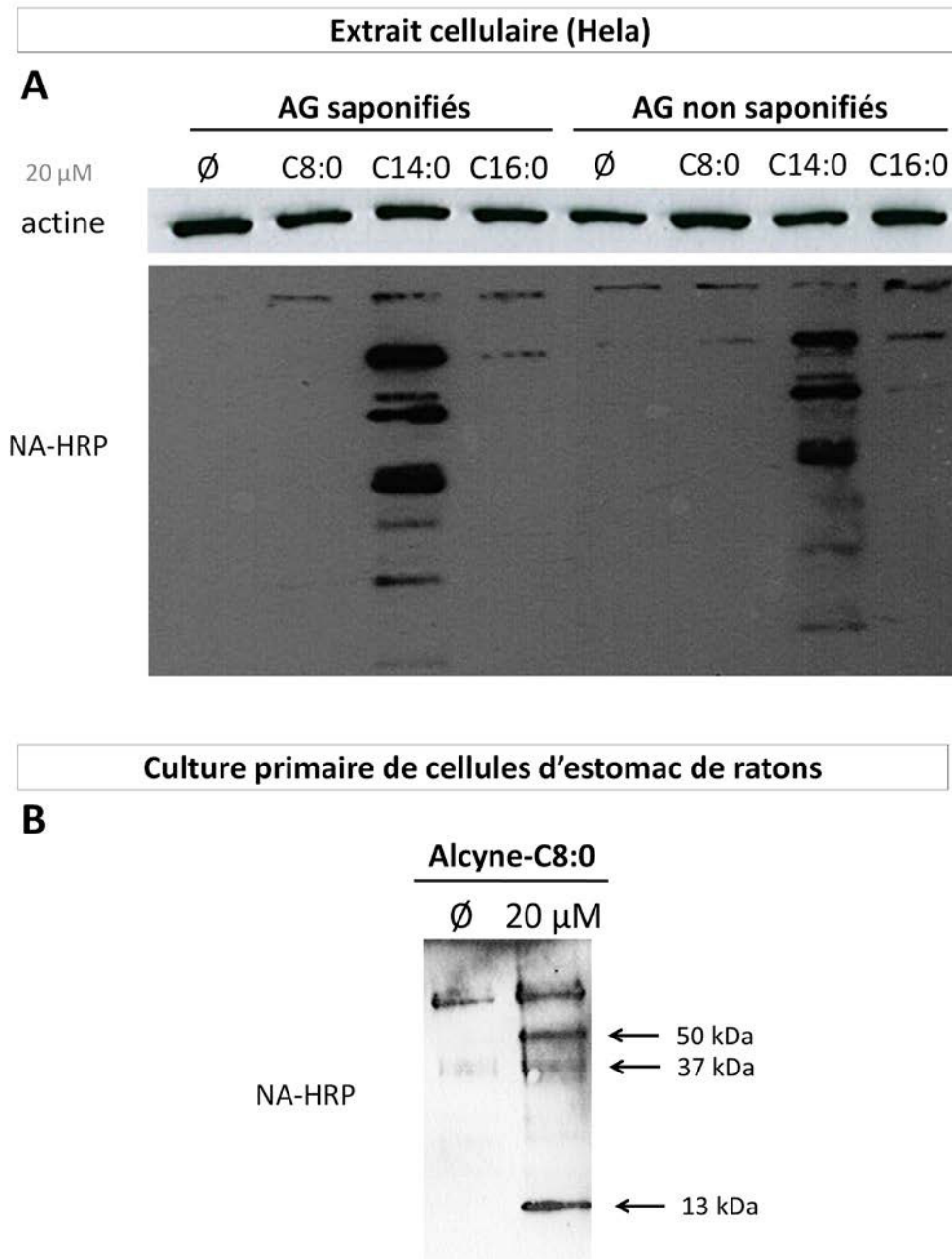


Figure 29. Détection de protéines octanoylées dans les cellules d'estomac de rats en culture primaire, par la technique de click chemistry (en comparaison avec les cellules HeLa)

- A)** Détection de protéines octanoylées, myristoylées et palmitoylées dans les cellules HeLa ;
B) détection de protéines octanoylées dans les cellules estomac de rats.

protocole de culture primaire des cellules d'estomac de rats a donc dû être modifié. Deuxièmement, la ghréline étant un peptide de faible poids moléculaire (3,3 kDa), il a fallu adapter le protocole d'électrophorèse et de transfert des protéines. Les gels classiquement utilisés pour les protéines avec un poids moléculaire plus élevé (gel de concentration à 3,5% d'acrylamide accolés à un gel de séparation à 10% d'acrylamide) ont été remplacés par des gels Tris-Tricine (Biorad) qui permettent de séparer les peptides. Le voltage et le temps de transfert par électrotransfert semi-sec (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad) ont été adaptés. À ces difficultés, s'ajoutent celles liées aux propriétés physico-chimiques de l'alcyne-C8:0, qui, comme le C8:0, est relativement volatile. L'étape de saponification en présence de NaOH suivie de l'évaporation sous flux d'azote a donc été supprimée.

Une fois les difficultés contournées, le marquage des protéines acylées a été réalisé dans des cellules HeLa (cellules cancéreuses du col de l'utérus), en tant que contrôle, et dans les cellules d'estomac en culture primaire (**Figure 29**). Les cellules HeLa ont été incubées avec des milieux sans alcyne ou contenant des complexes albuminiques d'alcyne-C8:0, -C14:0 ou -C16:0, saponifiés ou non (**Figure 29.A**). Les bandes présentes dans le témoin négatif correspondent à des protéines naturellement biotinylées, détectées par la NeutrAvidine-HRP. Les mêmes bandes sont observées pour les cellules incubées dans les alcyne-C8:0 et l'alcyne-C16:0, ne révélant pas de protéines acylées par ces deux acides gras dans les cellules HeLa. En revanche, pour les cellules HeLa incubées avec l'alcyne-C14:0, de nombreuses bandes potentiellement dues à la présence de protéines myristoylées sont observées. L'utilisation d'alcyne non saponifiés pour la complexation avec la BSA ne semble pas modifier les résultats de la click chemistry. L'incubation de milieux contenant des complexes albuminiques d'alcyne-C8:0 (non saponifiés) dans les cellules d'estomac de rats (**Figure 29.B**) révèle deux bandes de plus que dans le témoin négatif, à environ 13 et 50 kDa, ce qui correspond au poids moléculaire de la proghréline octanoylée libre dans le cytosol et potentiellement au poids de la proghréline ou de la ghréline toujours liée à la GOAT (45 kDa). La présence de protéines octanoylées a également été recherchée dans les milieux de culture des cellules d'estomac, la ghréline pouvant être sécrétée, mais aucun signal n'a été détecté (*résultats non inclus*).

C.3. Discussion

L'étude de l'utilisation cellulaire du C8:0 dans le foie, déjà largement décrite dans la littérature, a été réalisée ici afin d'être comparée au métabolisme du C8:0 dans les cellules gastriques. En accord avec d'autres études (Christensen et al., 1989; Ferré et al., 1983; Guillot et al., 1997; Pégorier et al., 1989), on observe que le C8:0 est rapidement capté par les hépatocytes, catabolisé par β -oxydation (50% du C8:0 initiale après 4 h ; **Tableau 14**) et est très faiblement incorporé dans les lipides cellulaires (**Figure 26.C**). Le $^{14}\text{CO}_2$ et les ^{14}C -métabolites acido-solubles formés par la β -oxydation diffusent librement à travers la membrane des cellules et sont retrouvés dans les cellules, mais également dans le milieu ; ce qui explique la faible baisse de radioactivité dans le milieu de culture (**Figure 26.A et B**). Les premières expériences d'incubations des hépatocytes avec des complexes albuminiques de C8:0 (0, 150 et 300 μM), en utilisant de la BSA délipidée (**Figure 27**), montrent une augmentation de la masse de certains acides gras (C14:0, C16:0, C16:1 n-9, C18:0), sans augmentation de la masse de C8:0. Un tel effet de l'acide octanoïque s'oppose à celui observé dans certaines études, réalisées avec des doses très élevées de C8:0 et C10:0 (1 à 1,2 mM) (Sato et al., 2005; Tachibana et al., 2005), mais a été observé dans des hépatocytes de poulet en culture primaire avec des doses de C8:0 plus modérées (Guillot et al., 1997). Le C8:0 pourrait stimuler la synthèse *de novo* (C16:0), l'allongement (C8:0→C14:0, C16:0→C18:0) et la désaturation (C16:0→C16:1, C18:0→C18:1) des acides gras. Ces résultats sont en accord avec l'effet de l'acide octanoïque dans le foie présenté dans la partie A.2.3.2., mais doivent être confirmés par d'autres expérimentations. En effet, le milieu contrôle contient une quantité trop faible d'acides gras (BSA délipidée et pas de compensation par d'autres acides gras) et les milieux contenant les complexes albuminiques de C8:0 (à 150 et 300 μM) contiennent de l'éthanol qui a pu être métabolisé par les hépatocytes et qui pourrait être responsable des effets observés (éthanol/milieu aqueux égal à 1:5000 et 1:2500 (v/v), respectivement pour les milieux à 150 et 300 μM C8:0).

Le métabolisme de l'acide octanoïque dans l'estomac n'a, à notre connaissance, pas été étudié *in vitro*, dans des cellules gastriques. L'objectif était ici de compléter les expérimentations *in vivo* présentées dans les parties A et B, et comparer le captage, la β -oxydation, la mise en réserve du C8:0 dans les triglycérides dans l'estomac et dans le foie,

pour comprendre s'il existe un mécanisme de préservation de cet acide gras pour assurer sa disponibilité pour l'octanoylation de la ghréline. Deux modèles d'études ont été mis en place : la culture de cellules gastrique de raton (8 jours) en culture primaire et les explants de fundus, corpus et antrum de raton. Le captage du C8:0 est faible (15 % de la radioactivité totale après 8 h) dans les cellules gastrique en culture primaire, et nul dans les explants, comme le montre les incubations avec des milieux contenant des complexes albuminiques de [1-¹⁴C]-C8:0 (**Figure 28**). La β -oxydation semble également être plus faible dans l'estomac, comparé au foie, la totalité de la radioactivité présente dans le milieu étant présente dans les lipides totaux. La quantification de la β -oxydation doit être faite par mesure du ¹⁴CO₂ et des ¹⁴C-métabolites acido-solubles formés pendant l'incubation des cellules gastriques avec du [1-¹⁴C]-C8:0, pour pouvoir être comparé aux résultats dans le foie (**Tableau 14**). L'acide octanoïque est mesuré dans les cellules gastriques et dans les explants, après incubation avec des milieux contenant des complexes albuminiques de [1-¹³C]-C8:0 ou de C8:0 non marqué en petite quantité, mais n'augmente pas lorsque la concentration en C8:0 augmente dans le milieu et la quantité d'acide octanoïque dans le milieu baisse très peu incubation. Il n'y a pas non plus d'effet de l'incubation des cellules avec le C8:0 sur les masses des autres acides gras présents dans les cellules. Les modèles *in vitro* ne permettent pas de reproduire l'absorption gastrique du C8:0 mise en évidence *in vivo* chez les rats ou ratons nourris avec la Tri-C8:0.

L'alcyne-C8:0 et la technique de click chemistry ont été utilisés dans une étude *in tubo*, pour la mise au point d'un essai de mesure de l'activité GOAT (Garner et al., 2010), mais pas en modèle *ex vivo* (culture primaire). L'incubation d'acide octanoïque portant la fonction ω -alcyne dans les cellules d'estomac de ratons (**Figure 29.B**) permet la détection de deux bandes qui pourraient correspondre la proghréline octanoylée libre ou lié à la GOAT, qui catalyse l'acylation de la proghréline. Il n'y a pas de bande au poids attendu de la ghréline octanoylée (3,3 kDa) dans les cellules ou le milieu de culture, ce qui peut être dû au fait que la quantité de ghréline est inférieure à la limite de détection de la technique. Les cellules HeLa ne synthétisent pas de ghréline octanoylée et par conséquent, l'absence de bandes supplémentaires par rapport au contrôle (**Figure 29.A**) confirme la spécificité des bandes obtenues après incubation d'alcyne-C8:0 dans les cellules gastriques. Une confirmation par LC-MS-MS sera nécessaire par la suite, pour valider ces résultats.

Conclusion de la partie C

Les outils méthodologiques (culture de cellules d'estomac de rats, click chemistry, analyses des AGCM) mis en place pendant ce doctorat devraient nous permettre d'étudier le métabolisme des AGCM dans les cellules épithéliales gastriques (captage, β -oxydation). De plus, la méthodologie de click chemistry est au point pour la détection de protéines octanoylées dans des cultures cellulaires, autres que les cellules d'estomac. Certaines études suggèrent en effet l'existence potentielle d'autres substrats protéiques de la GOAT (Albarran-Zeckler et al., 2011), d'autres études supportent l'idée contraire (Ohgusu et al., 2009; Yang et al., 2008b). Les perspectives sont présentées dans la discussion générale de ce travail.

Partie D

D. Mise en place de l'étude de la ghréline O-acyltransférase de rat (rGOAT): résultats préliminaires

Parmi les objectifs initiaux de mon doctorat figurait une étude moléculaire ciblée de l'utilisation du C8:0 par la ghréline O-acyltransférase (GOAT) pour l'octanoylation de la proghréline. Cette étude nécessitait la mise en place d'outils nouveaux au laboratoire, pour quantifier l'expression de la GOAT de rat (protéine native ou recombinante) et surtout pour mesurer son activité, avant d'envisager une analyse plus approfondie de ses régulations. La mise en place de ces différents outils a commencé dès le début de mon doctorat, mais a rencontré à chaque étape des difficultés méthodologiques qu'il a fallu contourner (faible spécificité des anticorps anti-GOAT commerciaux et difficultés pour faire migrer cette protéine dans les gels SDS-Page d'où la complexité de l'étude de l'enzyme native, difficultés de clonage et d'expression de la protéine GOAT recombinante). Ne sont donc présentés ici que les adaptations progressives des méthodologies mises en place pour contourner les difficultés, et des résultats préliminaires, qui devraient permettre par la suite une étude plus complète de cette enzyme, d'ailleurs détaillée dans les perspectives de ce travail.

D.2. Matériels et méthodes

D.2.1. Constructions plasmidiques

D.2.1.1. Clonage des ADN codant pour la GOAT, la préproghréline (PPG) et la ghréline de rat dans des plasmides d'expression

La séquence d'ADN codant pour la GOAT de rat (**Figure 30**) est connue et décrite dans la banque de données NCBI (NM_001107317.2, chromosome 16). Cette séquence a été clonée dans un plasmide d'intérêt pour permettre son expression dans un modèle cellulaire eucaryote. Des amorces ont été dessinées afin d'amplifier la séquence codante par PCR à partir d'une banque d'ADNc de rat. L'amorce sens (5'-aagcttgaattcatggattggctccagttc-3') possède 2 sites de restriction successifs HindIII (souligné) et EcoRI (en italique) juste avant le codon de début de transcription (en gras). L'amorce anti-sens (5'-tctagagcggccgctcagttacacttgtgtttctc-3') contient également 2 sites de restriction successifs XbaI (souligné) et NotI (en italique) avant le codon de fin de transcription (en gras). L'amplification par PCR a permis d'obtenir une bande d'environ 1300 pb (paires de bases) correspondant à la taille décrite de 1308 pb. Le produit de PCR a d'abord été inséré dans un 1^{er} plasmide, le pGEM-Teasy, puis sous-cloné dans le plasmide pcDNA3 adapté à l'expression en cellules de mammifères, en profitant des

Ghréline O-acyltransférase (GOAT)

```
1 atg gattggc tccagttctt ctttctccat cctgtatcac tttatcaagg ggctgcttcc
61 cccttcgcgc ttctgtttaa ttatctctgc atcacggaat cctttcccac ccgggccagg
121 tacctctttc tcttggtgg aggagggtgc ctggctttgg ccgccatggg tccctacgct
181 ctgctcattt tcatccctgc tctctgtgcc gtggctatga tctcctccct cagtccacag
241 gaagtccatg ggctgacttt cttctttcag atgggttggc aaacctgtg ccacctgggt
301 cttcactaca aggagtaacta cctgtgtgag cctccccctg tgaggttcta catcactctt
361 tcttccctca tgctcttgac gcagagagtc acgtctctct ccctggacat ttctgaaggg
421 aaggtggagg cagcgtggag gggcaccagg agcaggagtt ctttgtgtga gcacctgtgg
481 gatgctctac cctatatcag ctatctgtct tttttccctg cactcctggg aggctccctg
541 tgttcccttc agagatttca ggcttgctt caaagaccaa ggtctttgta tcccagtatc
601 tctttctggg ctctgacctg gaggggtctg cagatccttg ggctggagtg cctcaagggtg
661 gcgctgagga ggggtggtgag tgctggcgct ggactggatg attgccagcg actggagtg
721 atctacatca tgtggtccac cgctgggctc tttaaactca cctactactc ccaactggatc
781 ctggacgact ctctccttca cgcggcgggc tttggatctg aggctggcca gaggcctgga
841 gaggagagat acgtcccgga tgtggacatt tggacattgg aaactacca caggatctcc
901 ctgttcgcga ggcagtggaa ccgaagcaca gctcagtggc tcaagaggct tgcctgggtg
961 aggagccggc gctggcccgt gctgcagact tttgccttct ctgcctgggt gcacggactc
1021 caccaggac aggtgtttgg ctctctgtgc tggctctgta tggtgaaagc cgactactg
1081 atccacactt ttgccaatgg atgtatcaga tcttggcccc tgcggtctgt ttatagatcc
1141 ctcaactggg cccacactca gatcatcatt gcttacgtaa tgctggccgt ggaggccgg
1201 agcttttctt ctctctgccc gctgtgctgt tcttacaaca gtatcttccc tgtaacgtac
1261 tgctttttgc tttttctatt agcggaggaga aaacacaagt gtaac tga
```

Préproghréline (PPG)

```
1 ccagatcadc tgcctcacc accaaggcc a tgggtgtcttc agcgactatc tgcagtttgc
61 tactcctcag catgctctgg atggacatgg ccatggcagg ttccagcttc ctgagcccag
121 agcaccagaa agcccagcag agaaaggaat ccaagaagcc accagctaaa ctgcagccac
181 gagctctgga aggttggtc caccagagg acagaggaca agcagaagag gcagaggagg
241 agctggaat caggttcaat gctccctctg atgttggcat caagctgtca ggagctcag
301 accagcagca tggccgggccc ctgggaaagt ttcttcagga taccctctgg gaagaggcca
361 aagaggcggc agctaacaag taa ccaactga caggactggt ccctgtactt tctcctaag
421 caagaactca catccagctt ctgcctctc tgcaactccc agcactctcc tgctgactta
481 caaataaatg ttcaagctgt
```

Figure 30. Séquences d'ADN codant pour la ghréline O-acyltransférase (NM_001107317.2) et la préproghréline (NM_021669) de rat obtenues dans la banque de données NCBI

Les codons de début et fin de transcription sont en rouge. Dans la séquence de la préproghréline, la zone codant pour le peptide signal (69 bases soit 23 acides aminés) est en orange et la zone codant pour la ghréline (84 bases soit 28 acides aminés) est en bleu. Les zones soulignées correspondent aux amorces de clonage.

sites de restriction EcoRI et NotI. Ce plasmide a été appelé pcDNA3/rGOAT (**Figure 31**) et la qualité de la construction a été vérifiée par séquençage total.

De manière similaire, avec un objectif initial de co-expression avec la rGOAT, la séquence d'ADN codant pour la préproghréline (PPG) de rat (**Figure 30**), disponible dans la banque de données NCBI (NM_021669, chromosome 4), a été clonée. Les amorces sens (5'-atctgtcctcaccaccaagg-3') et anti-sens (5'-caggagagtcgtgggagttg-3') ont permis l'amplification par PCR d'une bande d'environ 345 pb correspondant à la taille attendue qui a été insérée dans le plasmide pcDNA3.1/V5/His/Topo. Cette construction vérifiée par séquençage a été appelée pcDNA3.1/rPPG.

Enfin, à partir de ce plasmide pcDNA3.1/rPPG, de nouvelles amorces ont été dessinées pour amplifier spécifiquement et uniquement la séquence d'ADN correspondant à la ghréline de rat (**Figure 30**). Les amorces sens (5'- **atgggttccagcttctga**-3') et anti-sens (5'-**ttccagagcttatcgtggctg**-3') ajoutent un codon de début de transcription sur l'extrémité 5' et un codon de fin de transcription sur l'extrémité 3' (en gras). Elles ont permis l'amplification par PCR d'une bande d'environ 90 pb correspondant à la taille attendue du fragment spécifique de la ghréline, qui a été clonée dans le plasmide pcDNA3.1/V5/His/Topo. La construction (pcDNA3.1/Ghr) a également été vérifiée par séquençage.

D.2.1.2. Obtention des plasmides en grande quantité

Après des étapes classiques de ligation, les différents plasmides sont amplifiés par transformation de bactéries compétentes (NEB TurboCompetent E. Coli, New England Biolabs). La préparation des plasmides en très grande quantité est effectuée grâce au QIAfilter Plasmid Mega Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). La concentration de l'ADN plasmidique extrait est déterminée par spectrophotométrie (1 unité de DO à 260 nm correspond à 50 µg/mL d'ADN) et la pureté de l'ADN est évaluée avec le ratio $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}}$.

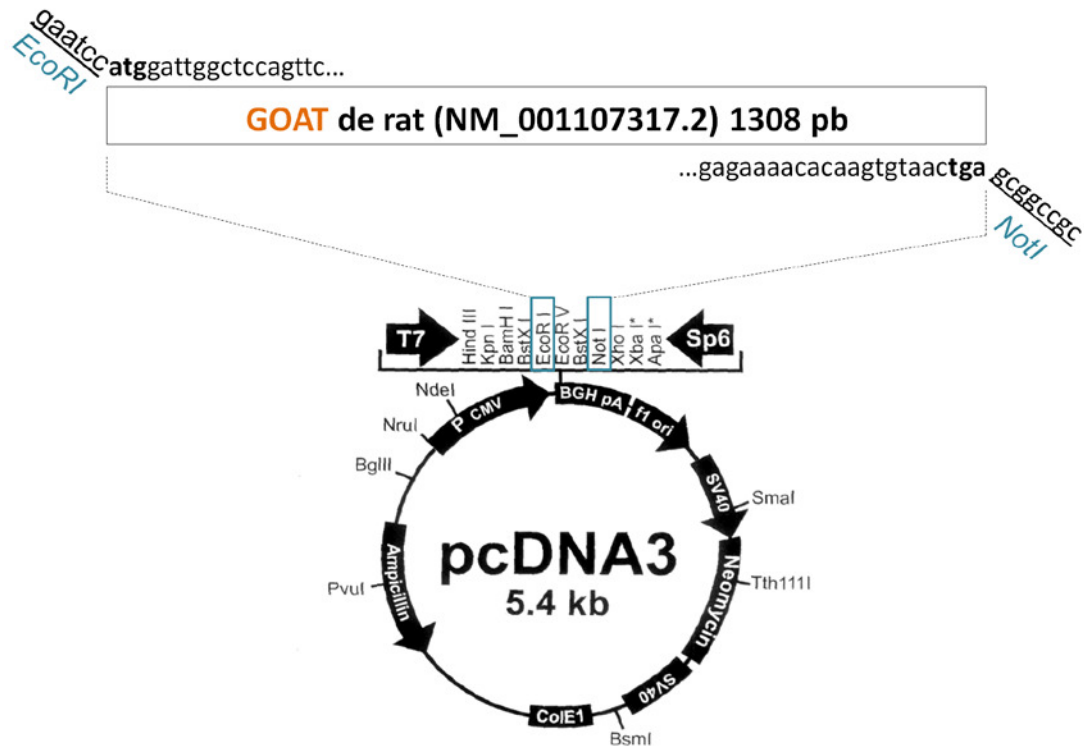


Figure 31. Clonage de la séquence d'ADN codant pour la GOAT de rat dans le plasmide pcDNA3.

L'ADNc de la GOAT de rat est amplifié par PCR en utilisant des amorces contenant respectivement les codons de début et fin de transcription, ainsi que des sites de restriction `EcoRI` et `NotI`. L'ADNc est inséré dans le plasmide après digestion par ces 2 enzymes.

D.2.2. Expression des protéines recombinantes d'intérêt dans des cellules eucaryotes de mammifères

D.2.2.1. Culture de lignées cellulaires

Les cellules COS-7 (cellules de rein de singe vert) sont classiquement utilisées au laboratoire comme modèle eucaryote de surexpression. D'autres lignées cellulaires, HeLa (cellules du col de l'utérus humain), CHO (cellules ovariennes de hamster), Caco2 (cellules épithéliales colorectales humaines) ont également parfois été utilisées lors de cette étude.

La culture des cellules COS-7 est réalisée dans des flasques de 175 cm² et dans un incubateur humidifié à 37°C en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture utilisé est composé de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich), de 10% de SVF (Sérum Veau Fœtal), 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 10 µg/mL de gentamycine. Lorsque les cellules sont à 70% de confluence, le milieu de culture est éliminé puis le tapis cellulaire est rincé par du PBS (Phosphate Buffer Saline ; NaH₂PO₄ 4 mM, Na₂HPO₄ 0,94 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) et décollé grâce à l'action d'une solution de trypsine-EDTA (Eurobio) pendant 2 min à 37°C. L'ajout de DMEM contenant du SVF permet d'arrêter l'action de la trypsine. Après une centrifugation de 5 min à 200 g, le culot cellulaire est suspendu dans du DMEM complet et les cellules sont soit redistribuées dans de nouvelles flasques pour amplifier la culture, soit lavées dans du DMEM sans SVF si elles sont destinées à être électroporées, soit encoreensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 mm pour une transfection le lendemain par des réactifs commerciaux.

D.2.2.2. Transfection transitoire par électroporation ou par des agents commerciaux

La transfection par électroporation est réalisée sur 800 µL de suspension cellulaire (10⁶ cellules) à laquelle est ajouté le plasmide d'intérêt (20 à 50 µg pour le plasmide pcDNA3/rGOAT). Le mélange est transféré dans une cuve d'électroporation de 4 mm (CellProjects, Harrietsham, UK) pour subir un choc électrique appliqué par un électroporateur Gene Pulser Xcell (Biorad, Marnes-la-Coquette, France) avec dans les conditions classiques un voltage de 250 V et une capacitance de 1500 µF. Le contenu d'une cuve est ensuite immédiatementensemencé dans une boîte de culture de 100 mm de diamètre contenant du

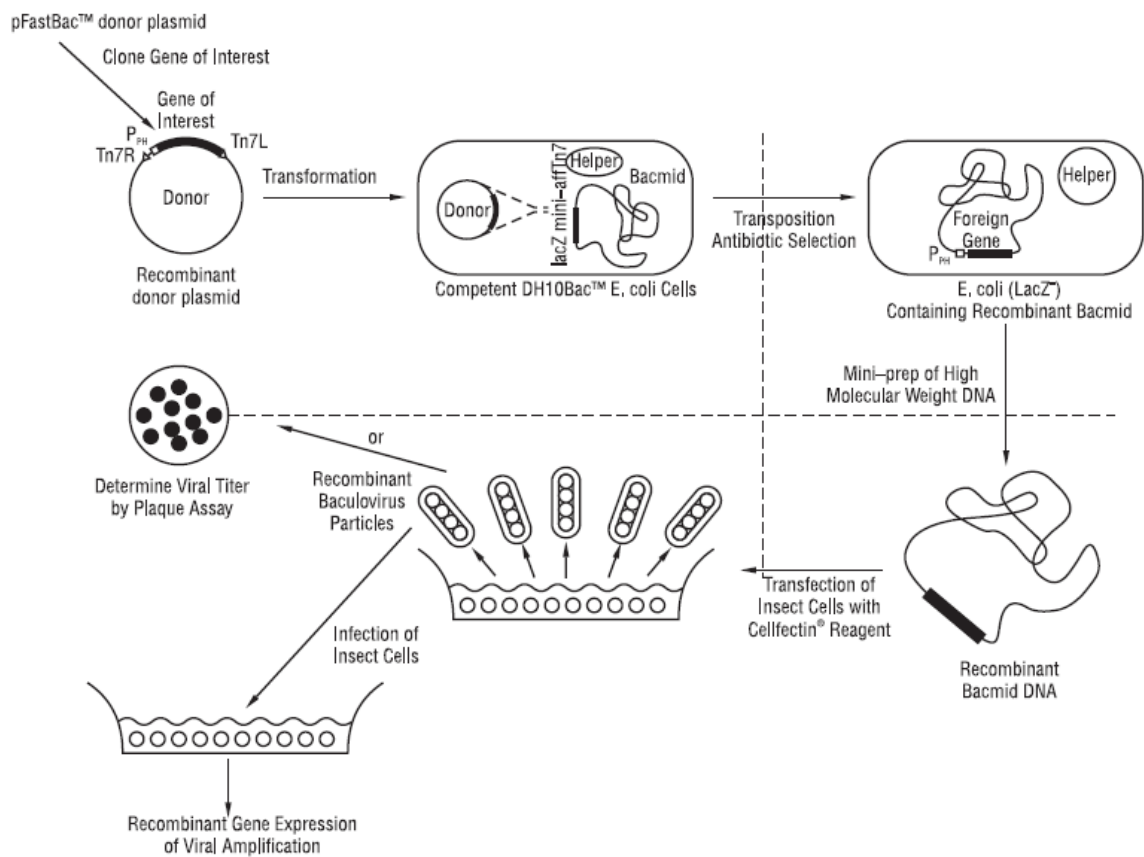


Figure 32. Représentation schématique des différentes étapes permettant l'expression d'une protéine recombinante dans des cellules d'insectes en utilisant le kit « Bac-to-Bac baculovirus expression system » (Invitrogen)

DMEM complet. Quatre heures après transfection, le milieu est systématiquement renouvelé afin d'éliminer les cellules mortes.

Le jour précédent la transfection par des réactifs commerciaux, les cellules COS-7 sont trypsinées puis ensemencées dans des boîtes de Pétri de 100 mm diamètre, à hauteur de 10^6 cellules/boîte dans 10 mL de DMEM complet. Les cellules sont incubées pendant 24 h à 37°C et en présence de 5% CO₂. Deux réactifs commerciaux de transfection ont ensuite été utilisés : le réactif Polyfect, selon les recommandations du fabricant Qiagen et le réactif FuGene HD selon les recommandations de Promega.

D.2.3. Expression des protéines recombinantes d'intérêt dans des cellules eucaryotes d'insectes

D.2.3.1. Culture des cellules Sf9

Les cellules Sf9 (Invitrogen) sont des cellules ovariennes provenant de *Spodoptera frugiperda*. Elles sont cultivées à 28°C en cellules adhérentes dans le milieu Sf900 II SFM (Gibco BRL) additionné de sérum de veau fœtal (10% v/v), 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine et 10 µg/mL de gentamycine. Les cellules sont décollées régulièrement par simple agitation et grattage pour être ensuite réensemencées et amplifiées.

D.2.3.2. Constructions des bacmides

Le kit « Bac-to-Bac baculovirus expression system » (Invitrogen) a été utilisé pour construire les bacmides recombinants et infecter progressivement les cellules Sf9 (**Figure 32**). Les étapes importantes sont (1) le transfert de l'insert rGOAT (construction commerciale pCMV6/rGOAT-myc-DDK d'Origene Technologies) vers le plasmide pFastBac qui contient des sites de restriction entourés de séquences virales encadrant le promoteur fort de la polyhédrine (qui permettra l'expression dans les cellules Sf9, la polyhédrose étant une maladie des insectes véhiculée par un baculovirus), (2) la transformation par ce plasmide pFastBac/rGOAT-myc-DDK de bactéries *E. Coli* compétentes DH10Bac qui contiennent déjà le bacmide vide (bMON14272, 136 kb) ainsi qu'un plasmide « helper » qui code pour une transposase qui va permettre une recombinaison par transposition du fragment [promoteur polyhédrine-rGOAT-myc-DDK] depuis le pFastBac vers le bacmide, (3) la vérification de la

réussite de cette recombinaison homologue par PCR, (4) la production du bacmide recombinant Bac/rGOAT-myc-DDK en grande quantité, (5) la transfection initiale des cellules Sf9 par le bacmide recombinant avec l'agent Cellfectin II pour obtenir un 1^{er} stock de particules virales (P1) suivi de la titration de ces particules virales par comptage visuel des plages de lyse, (5) la réinfection progressive (par cycle) des cellules Sf9 pour enrichir la production de virus (obtention d'un 2nd et d'un 3^{ème} stock, P2 et P3), eux-aussi titrés, (6) l'infection en masse finale des cellules Sf9 par un nombre connu de particules virales pour produire la protéine recombinante d'intérêt. Pour toutes ces différentes étapes, un baculovirus contrôle (sans insert = vide) a également été construit en parallèle.

D.2.4. Collecte des cellules et analyse des protéines par Western blot

Les cellules utilisées pour l'expression de la protéine rGOAT (cellules de mammifères ou cellules d'insectes) sont collectées dans leur milieu puis centrifugées (5 min, 500 g, 4°C). Le culot cellulaire est repris dans 200 µL de PBS et les cellules sont lysées par sonication aux ultrasons. Les concentrations protéiques des échantillons sont évaluées par la méthode de Bradford. Les protéines des lysats cellulaires sont séparées selon leur poids moléculaire (PM) par électrophorèse de type SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Les échantillons protéiques sont solubilisés dans du tampon Laemmli (glycérol 40%, β-mercaptoéthanol 20%, SDS 8%, bleu de bromophénol 0,02%, Tris/HCl 0,25 M, pH 6,8), dénaturés pendant 10 min à 70°C puis déposés dans un gel de concentration à 3,5% d'acrylamide, accolé à un gel de séparation à 10% d'acrylamide. Un marqueur de PM (Kaléidoscope, Biorad) est déposé. La migration s'effectue à 80 V pendant environ 3 h, dans un tampon de migration (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3) avec le système Mini Protean II (Biorad). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra (GE Healthcare) par un électrotransfert semi-sec (Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad) pendant 30 min à 25 Volt, dans un tampon de transfert (glycine 39 mM, SDS 1,3 mM, Tris 48 mM, méthanol 20%, pH 8,4). La membrane est ensuite saturée en protéines pendant 1h30 à température ambiante, sous agitation dans un tampon de saturation TBS-Tween (Tris Buffer Salt, Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%) à 10% de lait écrémé, puis incubée successivement avec l'anticorps primaire et secondaire *ad hoc* (détails des conditions d'incubation pour chaque anticorps utilisé dans le

Tableau 15. Conditions d'incubation des anticorps utilisés pour l'immunodétection des protéines par western blot (TBS-T : Tris Buffer Saline-Tween 0,5%)

Anticorps I ^{aire}	Distributeur	Conditions d'incubation	Anticorps II ^{aire}
Rabbit anti-rat MBOAT4 (L15)	Santa Cruz (sc-139395)	1/500 ^{ème} TBS-T-Lait écrémé 5%	Anti-IgG lapin
Rabbit anti-MBOAT4	Sigma SAB1301282	1/200 ^{ème} TBS-T-Lait écrémé 5%	Anti-IgG lapin
Monoclonal anti-Flag M2	Sigma F3165	1/500 ^{ème} TBS-T-Lait écrémé 5%	Anti-IgG souris

Tableau 16. Conditions d'incubation pour la mesure de l'activité de la GOAT recombinante de rat.

	Témoin sans peptide	Témoin avec peptide non octanoylable	Essais
Microsomes (50 µg de protéines)	10 µL	10 µL	10 µL
C16-CoA 5 mM	2 µL	2 µL	2 µL
Tampon Hepes 50 mM	86 µL	84 µL	84 µL
Peptide 5 mM	0 µL	2 µL GSAFL-NH ₂	2 µL GSSFL-NH ₂
¹⁴ C-C8:0-CoA 5 mM	2 µL (début de la réaction)	2 µL (début de la réaction)	2 µL (début de la réaction)
Volume total	100 µL	100 µL	100 µL

Tableau 15). Entre chaque bain d'anticorps, la membrane est rincée 3 fois au TBS-Tween pendant 10 min. L'anticorps secondaire étant couplé à la Horseradish Peroxydase (HRP), la détection des protéines d'intérêt s'effectue en visualisant l'activité peroxydase grâce aux réactifs Immobilon (Millipore, Molsheim, France) sur des films photographiques sensibles à la chemiluminescence (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Orsay, France). Le film est ensuite développé à l'obscurité par des bains successifs de solution de révélation et de fixation.

D.2.5. Mesure de l'activité de la GOAT de rat

Les cellules utilisées pour l'expression de la protéine rGOAT recombinante (cellules de mammifères ou cellules d'insectes) sont collectées dans leur milieu puis centrifugées (5 min, 500 g, 4°C). Le culot cellulaire est repris dans 10 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM NaEDTA, 1 mM DTT) et les cellules sont lysées par 20 allers-retours au potter. Une 2^{ème} centrifugation (5 min, 3000 g, 4°C) permet d'éliminer les mitochondries. Le surnageant post-mitochondrial est récupéré et centrifugé à nouveau à haute vitesse (1 h, 100 000 g, 4°C) pour isoler les microsomes. Ceux-ci sont resuspendus dans 200 µL d'HEPES à 50 mM pH 7,0 par plusieurs passages dans une seringue. Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford.

La mesure d'activité de la GOAT de rat est réalisée à 37°C dans un volume total de 100 µL, dans des tubes en verre sous agitation. Les conditions classiques d'incubation sont les suivantes : 50 µg de protéines microsomales (10 µL) et 2 µL de palmitoyl-CoA à 5 mM (pour préserver la dégradation rapide de l'octanoyl-CoA substrat) dilués dans du tampon HEPES 50 mM pH 7,0 (**Tableau 16**). Les 2 co-substrats de la GOAT sont ensuite ajoutés : 2 µL du pentapeptide amidé GSSL-NH₂ à 5 mM (remplacé dans les contrôles par du tampon seul ou par le pentapeptide amidé non octanoylable GSAFL-NH₂) puis 2 µL de [1-¹⁴C]-octanoyl-CoA (5 mM dans l'éthanol et 10 µCi/µmol, Isobio, Belgique) qui permet le début de la réaction. Après différents temps d'incubation (entre 5 min et 2 h), la réaction est stoppée par addition de 100 µL méthanol et 10 µL d'acide trichloroacétique (TCA 100%). Après agitation, les protéines sont précipitées pendant 10 min dans la glace et une centrifugation (10 min, 2000

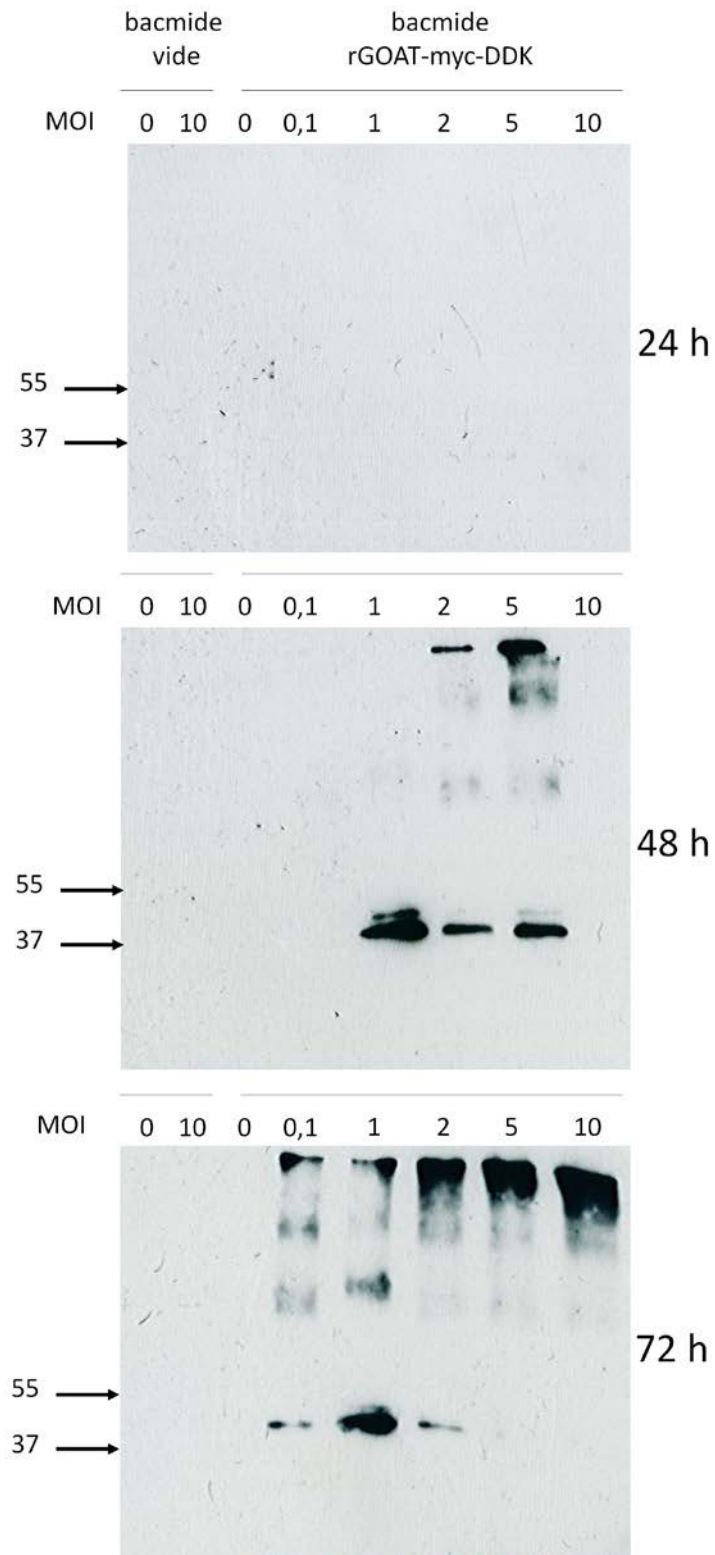


Figure 33. Western blot utilisant un anticorps anti-flag (anti-DDK) pour mesurer l'expression de la protéine recombinante rGOAT-myc-DDK, après infection des cellules Sf9 par différentes concentrations de l'inoculum P3 des constructions du bacmide rGOAT-myc-DDK et du bacmide vide contrôle (MOI : multiplicity of infection), en fonction du temps (24, 48, 72h).

rpm, 4°C) permet de les éliminer. Le surnageant est alors transféré dans un tube HPLC avant analyse.

Les échantillons (80 µL) sont injectés et séparés par HPLC (Système intégré Alliance 2690, Waters, St-Quentin en Yvelines, France). La séparation est basée sur une chromatographie de partage entre une colonne de silice greffée apolaire en C18 (Nova-Pak C18, 4 µm, 4,6 mm x 250 mm, Waters) précédée d'une colonne de garde (Nova-Pak C18, 4 µm, 3,9 x 20mm, Waters) thermostatées à 30°C. L'éluant (1,2 mL/min) est formé d'un mélange binaire eau MilliQ/0,05 % Acide TrifluoroAcétique (TFA) et acétonitrile/0,05 % TFA (Fisher, Elancourt, France). Le gradient optimal (50 min) après mises au point débute à 100/0 (v/v), évolue à 40/60 (v/v) en 30 min puis à 0/100 en 10 min, se stabilise pendant 5 min et revient aux conditions initiales en 5 min. Des fractions sont collectées entre 18 et 32 min par intervalles de 15 s afin de définir un profil radioactif et de déterminer les temps de rétention du substrat ([1-¹⁴C]-octanoyl-CoA) et du produit (¹⁴C-octanoylpeptide) issus de l'activité Ghréline O-acyltransférase.

D.3. Résultats

D.3.1. Tentatives multiples d'expression de la GOAT recombinante de rat dans des cellules eucaryotes de mammifères

En utilisant le plasmide initial pcDNA3/rGOAT, de nombreux essais d'expression de la protéine rGOAT ont été réalisés dans différentes lignées cellulaires : cellules COS-7 (cellules de rein de singe vert), HeLa (cellules du col de l'utérus humain), CHO (cellules ovariennes de hamster), Caco2 (cellules épithéliales colorectales humaines). Différentes méthodologies de transfection ont aussi été utilisées : électroporation, différents agents de transfection commerciaux. Malgré de nombreux essais faisant varier l'ensemble des paramètres (temps d'incubation après transfection du plasmide, ratio ADN/agent de transfection), nous n'avons jamais réussi à mettre en évidence une expression de la protéine recombinante rGOAT par western blot. Devant cet échec, nous avons fait 3 hypothèses :

1) une erreur possible dans notre clonage initial de l'ADN codant pour la GOAT de rat,

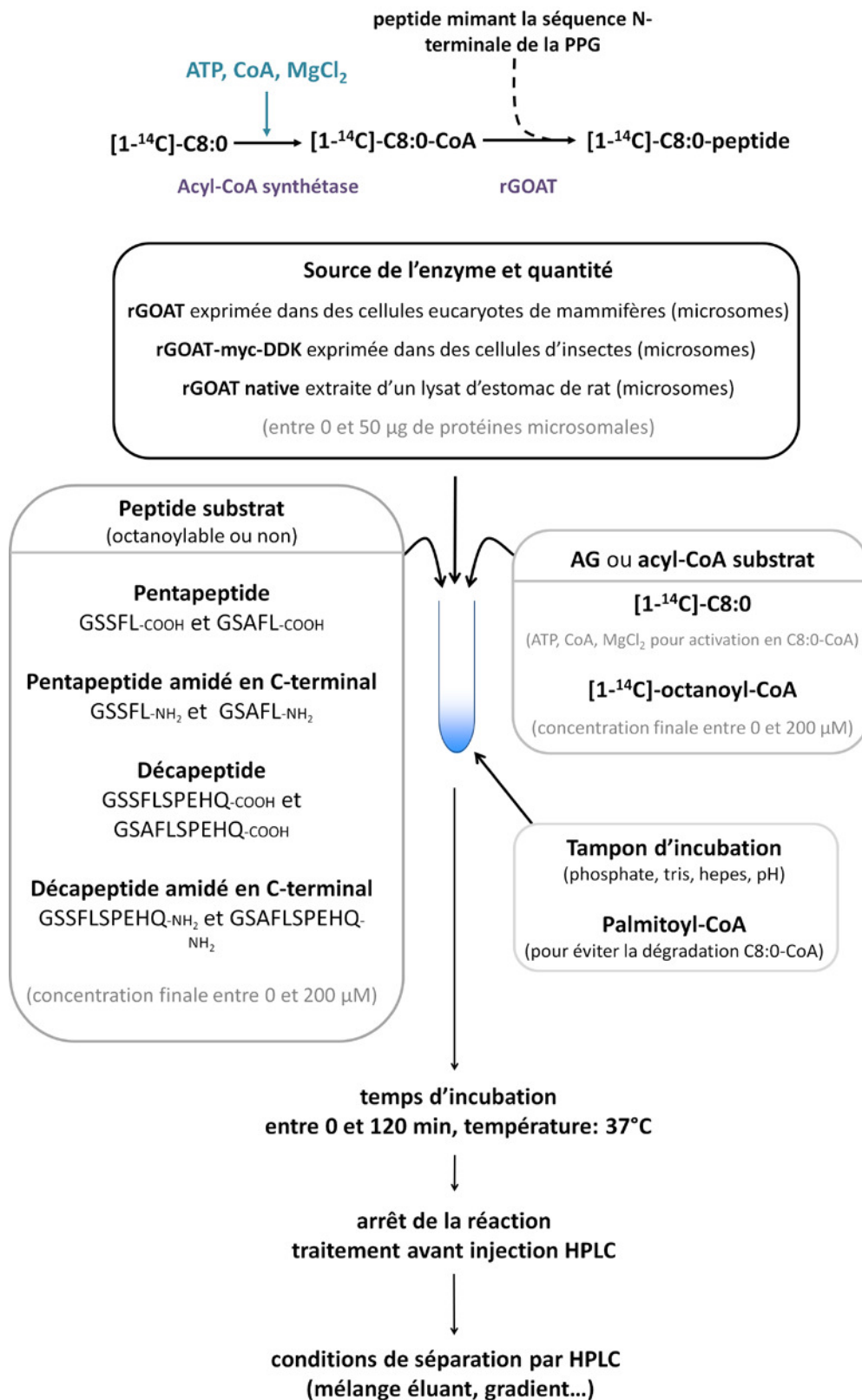


Figure 34. Représentation schématique des différentes conditions d'incubation testées pour mesurer in vitro l'activité de la GOAT de rat.

- 2) l'absence de réelle spécificité des anticorps primaires commerciaux (Santa Cruz et Sigma) dirigés contre la GOAT de rat, servant à la révélation finale de l'expression,
- 3) les cellules eucaryotes de mammifères ne sont peut-être pas « le bon modèle » (Bernaudat et al., 2011) pour exprimer cette protéine transmembranaire très hydrophobe qui possède apparemment 11 hélices transmembranaires (Taylor et al., 2013).

Pour répondre rapidement à ces hypothèses, nous avons fait le choix de commander directement des constructions plasmidiques commerciales (OriGene Technologies) : un plasmide contenant l'insert GOAT de rat sans épitope (pCMV6/rGOAT) et un plasmide GOAT de rat avec 2 épitopes protéiques successifs (épitope myc et épitope DDK) facilement détectables par western blot (pCMV6/rGOAT-myc-DDK). De nouvelles tentatives d'expression de la protéine rGOAT ont été réalisées en utilisant ces plasmides commerciaux, conduisant au même résultat négatif.

D.3.2. Expression de la GOAT recombinante de rat dans des cellules d'insectes

L'expression en cellules de mammifères n'ayant pas permis d'obtenir la protéine rGOAT recombinante, la décision a été prise de tenter d'exprimer la GOAT de rat dans des cellules eucaryotes d'insectes, puisque la bibliographie montre que ce modèle a déjà été utilisé avec succès (Darling et al., 2015; Taylor et al., 2013). La culture de cellules d'insectes Sf9 et la méthodologie moléculaire utilisant un baculovirus recombinant ont donc été mises en place au laboratoire, après quelques jours de formation avec le Dr. Stéphane Canaan (Laboratoire d'Enzymologie Interfaciale et Physiologie de la Lipolyse, UMR 7282 CNRS - Aix-Marseille Université) que nous remercions vivement.

Les étapes longues et fastidieuses de biologie moléculaire permettant la construction du baculovirus recombinant contenant l'insert codant pour la rGOAT (nous avons utilisé seulement la construction rGOAT-myc-DDK commerciale) ainsi que les cycles progressifs d'infection des cellules Sf9 conduisant à l'enrichissement en particules virales et permettant d'obtenir un stock final (P3) caractérisé par son titre viral ne sont pas redétaillés ici (cf. Matériels et Méthodes). Finalement, l'infection en masse des cellules Sf9 a été réalisée par différentes concentrations (MOI: multiplicity of infection) du stock viral P3 des baculovirus rGOAT-myc-DDK et contrôle, en fonction du temps (24, 48 et 72 h). La révélation de

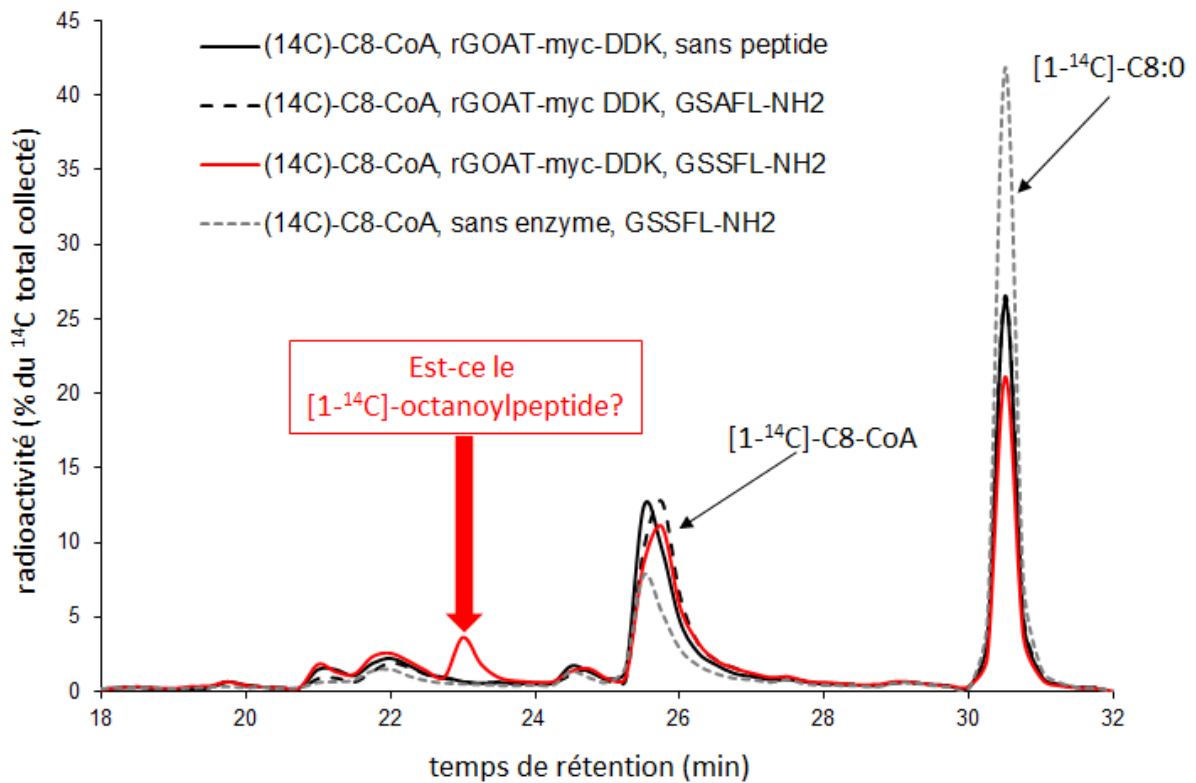


Figure 35. Profils radioactifs obtenus après séparation par HPLC des échantillons issus de différentes conditions d'incubations (Un témoin incubé sans peptide substrat, un témoin incubé avec un peptide muté pour la sérine potentiellement octanoylable, un témoin sans enzyme et finalement un essai) permettant la mesure de l'activité de la GOAT-myc-DDK de rat exprimée dans des cellules d'insectes. Le comptage radioactif des collectes (fractions de 15 s) est réalisé en sortie de colonne.

l'expression protéique (lysat cellulaire total) par western blot anti-flag (anti-DDK) montre la présence reproductible et spécifique d'une bande détectée à 40-50 kDa dans les cellules infectées par un MOI supérieur à 1 après 48 h d'infection (**Figure 33**). La taille de cette bande correspond à la taille prédite (50 kDa) de la GOAT de rat qui contient 434 acides aminés.

D.3.3. Mesure *in vitro* de l'activité de la GOAT recombinante de rat

En utilisant désormais l'expression en cellules d'insectes, nous avons pu débiter les 1^{ers} essais de mesure de l'activité de la GOAT recombinante de rat. Nous avons ici adapté une méthodologie classiquement utilisée au laboratoire pour mesurer *in vitro* l'activité des myristoyl-CoA : protéines N-myristoyltransférases (NMT) (Rioux et al., 2006). L'objectif est d'apporter à l'enzyme (fraction microsomale des cellules d'insectes) ses deux co-substrats, le [1-¹⁴C]-octanoyl-CoA et un peptide mimant la séquence N-terminale de la proghréline (GSSFL) pour quantifier la formation du [1-¹⁴C]-octanoyl-peptide en utilisant le traceur ¹⁴C, en fonction du temps (**Figure 34**). Les différentes molécules issues de l'incubation sont séparées par HPLC, collectées et leur radioactivité est finalement déterminée.

Après de nombreuses mises au point sur les conditions d'incubation puis de séparation par HPLC, la **Figure 35** montre les différents profils de radioactivité obtenus en fonction du type d'échantillon : un témoin incubé sans peptide substrat, un témoin incubé avec un peptide muté pour la sérine donc « non-octanoylable », un témoin sans enzyme et finalement un essai. Deux pics importants de radioactivité sont détectés dans tous les échantillons : ils correspondent au substrat [1-¹⁴C]-octanoyl-CoA (temps de rétention = 25,5 min) et à l'acide [1-¹⁴C]-octanoïque (temps de rétention = 31 min), ce qui confirme que l'octanoyl-CoA substrat, décrit comme peu stable, est partiellement dégradé au cours de l'expérimentation. Un pic supplémentaire spécifique et reproductible de radioactivité (temps de rétention = 23 min) est détecté seulement dans l'échantillon « essai » (**Figure 36**), qui rassemble toutes les molécules susceptibles de conduire à l'octanoylation du peptide substrat. Nous avons donc suspecté que ce pic correspondait au [1-¹⁴C]-octanoyl-peptide formé au cours de l'incubation.

En l'absence de standard permettant d'identifier formellement ce produit de réaction, nous avons réalisé des incubations identiques utilisant cette fois le substrat octanoyl-CoA froid, collecté le pic correspondant à l'octanoyl-peptide suspecté et analysé cette collecte par

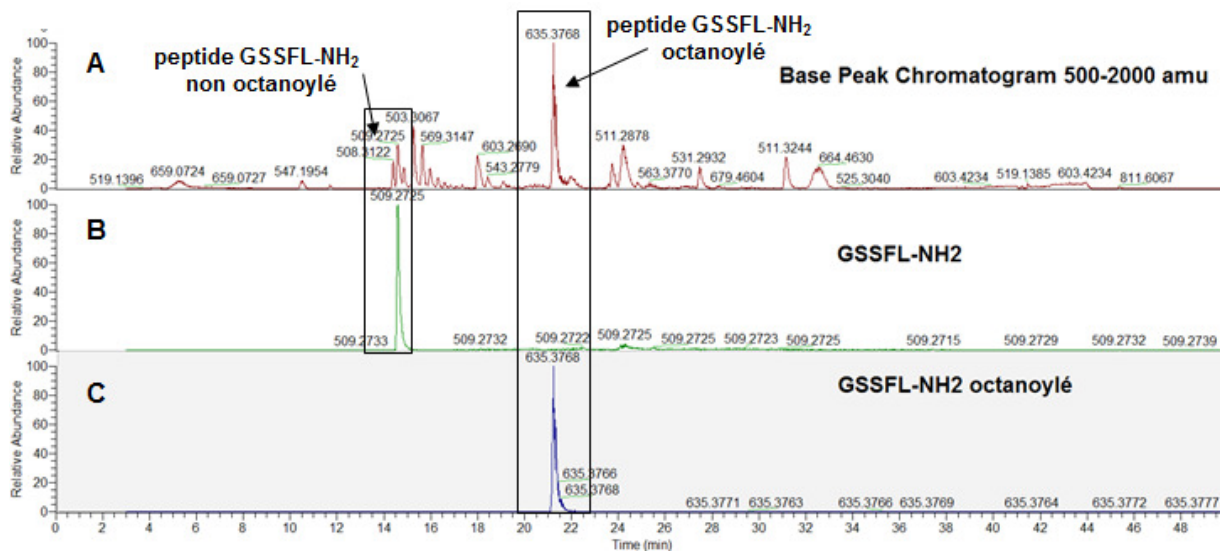


Figure 36. Analyse par nanoLC-ESI-MS du pic correspondant à l'octanoyl-peptide suspecté.

En l'absence de standard permettant d'identifier formellement le produit de réaction, nous avons réalisé des incubations identiques à celles réalisées avec le substrat [1-¹⁴C]-octanoyl-CoA mais utilisant cette fois le substrat octanoyl-CoA froid, collecté le pic correspondant à l'octanoylpeptide suspecté et analysé cette collecte par chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse.

chromatographie liquide couplée à une détection par spectrométrie de masse (nanoLC-ESI-MS/MS à la plateforme d'analyse protéomique du laboratoire Science et Technologie du Lait et de l'œuf, STLO, INRA Rennes). Les résultats de cette analyse sont présentés sur les **Figures 36 et 37**. La **Figure 36.A** montre tout d'abord le profil obtenu en LC-MS du pic collecté. Dans la fenêtre balayée (500-2000 amu), le pic majoritaire détecté (temps de rétention 21,5 min) possède un ion $[M+H]^+$ de 635,3 amu qui correspond à la masse théorique du pentapeptide GSSFL-NH₂ octanoylé (**Figure 36.B**). Dans ce profil se trouvent également une faible part du peptide GSSFL-NH₂ non-octanoylé (temps de rétention 14,5 min, ion $[M+H]^+$ de 509,2 amu, **Figure 36.C**) ainsi que d'autres molécules non identifiées.

Bien que peu propres, les spectres de masse obtenus par fragmentation MS/MS des peptides de masse $[M+H]^+=635,3$ (**Figure 37.A**) et $[M+H]^+=509,2$ amu (**Figure 37.B**) montrent des ions très spécifiques conduisant à l'identification concluante de ces deux peptides, dont l'écart de 126,1 amu représente l'octanoyl. L'ion immonium de la sérine libre (60,04 amu) est par exemple détecté dans les 2 spectres, mais ce même ion immonium correspondant à la sérine octanoylée (186,14 amu) n'est présent que dans le spectre du peptide majoritaire (**Figure 37.A**). De manière identique, les ions de masse 232,09 et 379,16 amu correspondent respectivement aux ions b des peptides GSS et GSSF (**Figure 37.B**) et leur octanoylation augmente leur masse à 358,19 et 505,26 amu (**Figure 37.A**). Enfin, les ions y de la leucine libre (131,11 amu) et du peptide FL (278, 18 amu) sont retrouvés de manière cohérente dans deux spectres.

Ce résultat démontre donc que le pic surnuméraire collecté à 23 min contient bien l'octanoyl-peptide produit au cours de la réaction *in vitro*. La faible présence concomitante du peptide non octanoylé peut paraître surprenante puisque son temps de rétention est bien inférieur, mais nous avons fait l'hypothèse qu'il pouvait provenir d'une dégradation de l'octanoyl-peptide lors du stockage puis des traitements de l'échantillon collecté (évaporation, concentration), avant analyse par LC-MS/MS.

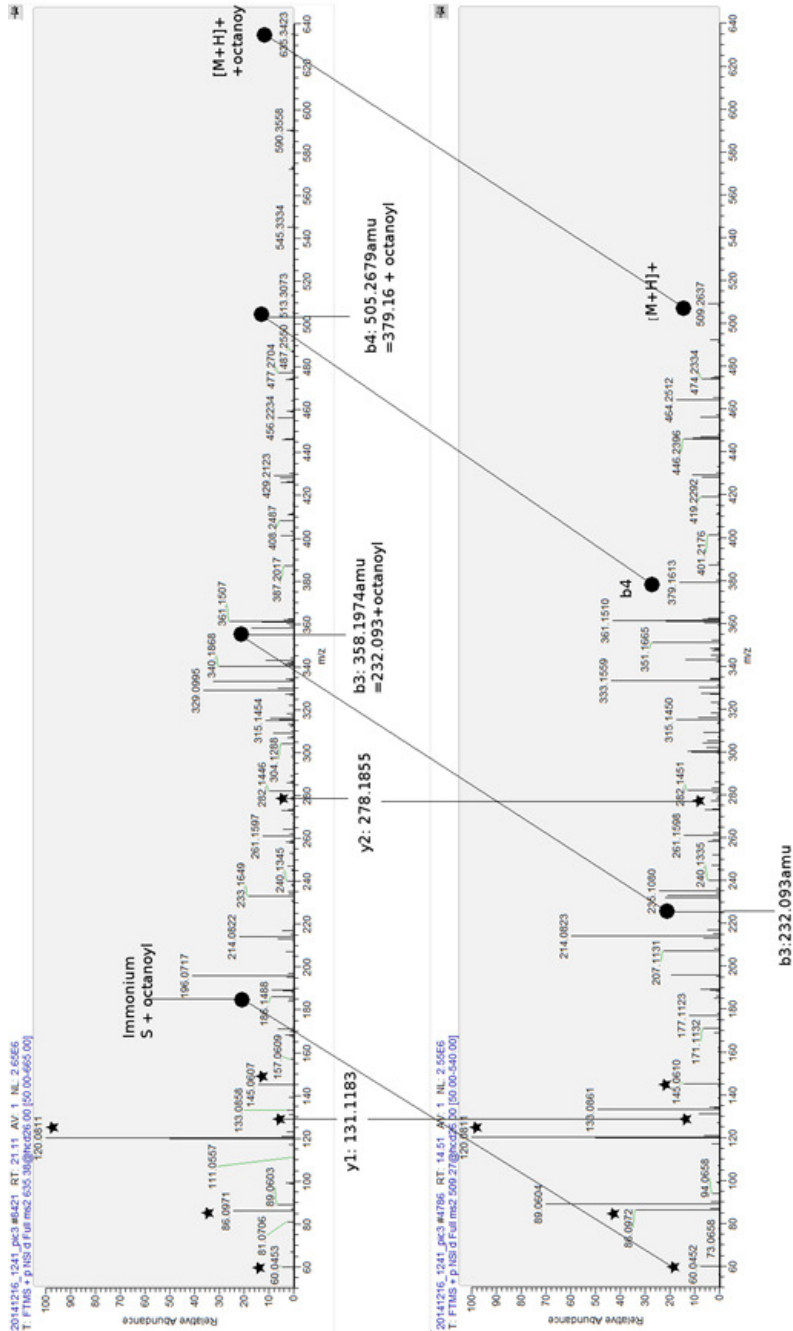


Figure 37. Spectres de masse obtenus par fragmentation MS/MS des peptides de masse $[M+H]^+ = 635,3$ et $[M+H]^+ = 509,2$ amu.

L'ion immonium de la sérine libre (60,04 amu) est détecté dans les 2 spectres, mais ce même ion immonium correspondant à la sérine octanoylée (186,14 amu) n'est présent que dans le spectre du peptide majoritaire. De manière identique, les ions de masse 232,09 et 379,16 amu correspondent respectivement aux ions b des peptides GSS et GSSF et leur octanoylation augmente leur masse à 358,19 et 505,26 amu. Enfin, les ions y de la leucine libre (131,11 amu) et du peptide FL (278, 18 amu) sont retrouvés de manière cohérente dans les 2 spectres.

D.4. Discussion et perspectives

Depuis son identification en 2008 par deux laboratoires indépendants (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008a), la ghréline O-acyltransférase (GOAT), membre de la famille des membrane-bound O-acyltransférases (MBOAT), est devenue l'objet de nombreuses recherches. Son action dans les cellules de l'estomac régule en effet, au moins partiellement, la concentration plasmatique en ghréline octanoylée qui correspond à la forme active de cette hormone peptidique. Des méthodologies spécifiquement adaptées à l'étude de cette enzyme sont progressivement décrites : par exemple, la co-transfection de la préproghréline et de la GOAT dans des cellules INS-1 incubées avec l'acide octanoïque tritié, suivie d'une purification et quantification des peptides tritiés ou d'une autoradiographie (Yang et al., 2008a). En 2012, un volume entier de la revue *Methods in Enzymology* (volume 514) est consacré à la ghréline et à la GOAT, montrant le développement de mesures enzymatiques *in vitro* et d'outils associés pour la détection de la ghréline octanoylée (anticorps spécifiques de la forme octanoylée et de la forme non octanoylée). En mettant en présence la ghréline non octanoylée de rat avec l'octanoyl-CoA et des microsomes de cellules CHO exprimant stablement la GOAT recombinante de souris, Ohgusu et al. (2012) montrent de manière surprenante que l'enzyme a une affinité supérieure pour l'hexanoyl-CoA que pour l'octanoyl-CoA. Taylor et al. (2012) décrit également le développement de ces nouveaux modèles cellulaires *in vitro* permettant la mesure de l'activité de la GOAT et la recherche d'inhibiteurs associés.

Parmi les objectifs initiaux de ce doctorat figurait une étude moléculaire ciblée de l'utilisation de l'acide octanoïque par la ghréline O-acyltransférase (GOAT) pour l'octanoylation de la proghréline : meilleure compréhension du mécanisme, meilleure caractérisation de l'enzyme catalysant cette réaction. Le laboratoire possède depuis 10 ans une expertise sur l'étude des myristoyltransférases recombinantes et sur l'analyse des protéines myristoylées (Beauchamp et al., 2007, 2009; Rioux et al., 2006). Nous avons donc espéré pouvoir transposer rapidement cette expertise à l'étude de l'octanoylation de la ghréline par la ghréline O-acyltransférase. Malheureusement, comme le montrent les résultats préliminaires obtenus, cette transposition n'a pas été simple. Nous avons d'abord abandonné l'objectif initial d'une expression de la GOAT dans un modèle de cellules eucaryotes de mammifères.

Cette enzyme définie comme une protéine membranaire intégrale (Taylor et al., 2013) possède en effet 11 domaines transmembranaires ancrés dans le réticulum endoplasmique et cette structure complexe semble un paramètre important conduisant à des difficultés d'expression en modèle transitoire. Seulement deux publications (Barnett et al., 2010; Ohgusu et al., 2012) décrivent ainsi l'expression réussie de cette enzyme en modèle eucaryote mammifère. En conséquence, nous avons également abandonné l'objectif suivant de co-exprimer la GOAT et la préproghréline ou la ghréline dans ces mêmes cellules. En revanche, les publications décrivant l'expression de la GOAT humaine ou de souris dans des cellules d'insectes sont plus nombreuses (Darling et al., 2015; Garner and Janda, 2010, 2011; Taylor et al., 2012, 2013; Yang et al., 2008a). Nos résultats (**Figure 33**) montrent également cette expression de la GOAT de rat dans des cellules d'insectes et son utilisation réussie pour mesurer l'activité *in vitro* de l'enzyme (**Figures 35-37**). Les perspectives immédiates et à plus long terme de ces travaux préliminaires sont :

(1) l'étude des caractéristiques enzymologiques (K_m , V_{max}) de la ghréline O-acyltransférase recombinante de rat exprimée dans les cellules Sf9, en comparaison avec les GOAT humaine et de souris mieux caractérisées (Darling et al., 2013, 2015; Taylor et al., 2013).

(2) l'étude de l'affinité de la GOAT de rat pour son substrat acyl-CoA, en fonction de sa longueur de chaîne carbonée mais aussi éventuellement du nombre de doubles liaisons. Lors des différentes mises au point préliminaires, nous avons déjà montré (**Figure 34**) que si l'on remplace le $[1-^{14}C]$ -octanoyl-CoA par de l'acide $[1-^{14}C]$ -octanoïque, aucune activité n'est mise en évidence, même en apportant les cofacteurs nécessaires (ATP, coenzyme A et Mg^{2+}) à la formation de l'octanoyl-CoA par une octanoyl-CoA synthétase (sans doute absente dans les microsomes de cellules Sf9).

(3) l'étude de l'affinité de la GOAT de rat pour son substrat peptidique, en fonction de sa composition en acides aminés. Lors des différentes mises au point préliminaires, nous avons déjà montré (**Figure 34**) que le pentapeptide substrat doit être absolument amidé en C-terminal pour conduire à une activité et nous avons confirmé que la présence de la sérine en position 3 est indispensable à l'octanoylation. L'utilisation d'autres peptides de longueur différente (nous avons déjà les décapeptides correspondants) et de composition variée est

prévue. Cette étude permettrait notamment de comprendre pourquoi la proghréline est actuellement le seul substrat peptidique de la GOAT décrit *in vivo*.

(4) à plus long terme, on peut envisager transposer ces méthodologies vers l'étude de la GOAT native exprimée dans les cellules de l'estomac. Cependant, nous avons déjà utilisé sans succès des extraits d'estomac de rat comme source potentielle de l'enzyme GOAT pour les essais d'activité. Ceux-ci contiennent sans doute aussi de la ghréline ou de la proghréline, ce qui impose une étape de purification au moins partielle de l'enzyme avant son utilisation pour une mesure d'activité *in vitro*.

Discussion générale, perspectives et conclusion

L'homéostasie énergétique est régulée par le système nerveux central (SNC) qui est informé en permanence de la disponibilité en nutriments dans le tube digestif et des réserves dans les tissus adipeux. La communication entre le SNC et le système gastro-intestinal (SGI) passe par voies nerveuse et endocrinienne, ainsi que par la détection de nutriments dans le sang. Certains lipides (appelés lipokines) jouent des rôles particuliers dans la régulation de l'équilibre énergétique : l'acide palmitoléique (C16:1 n-7), sécrété par des adipocytes, semble réguler la sensibilité à l'insuline (Cao et al., 2008) et le N-acylphosphatidyléthanolamine (NAPE), sécrété par l'intestin, diminue la prise alimentaire et favorise la perte de poids en agissant sur l'hypothalamus (Gillum et al., 2008). L'acide octanoïque qui acyle la Ser₃ N-terminale de la ghréline, après action de la Ghréline O-acyltransférase (GOAT) (Yang et al., 2008b), est un autre exemple de lipide impliqué dans la communication SNC-SGI. La ghréline octanoylée, synthétisée principalement par l'estomac puis sécrétée dans le sang, stimule la sécrétion de GH (Growth hormone), l'adiposité et influence l'homéostasie du glucose. Mais c'est surtout par son puissant effet orexigène, *via* l'activation des neurones NPY/AgRP, que la ghréline octanoylée se distingue des autres peptides gastro-intestinaux circulants (Kojima et al., 2005).

Les effets physiologiques de la ghréline octanoylée ont fait l'objet de très nombreuses études au cours des 15 dernières années, parfois controversées. L'origine des AGCM (principalement le C8:0) qui acylent la ghréline et l'effet de leur consommation sur la régulation de l'axe ghréline-GOAT, en considérant le métabolisme particulier de ces acides gras, restaient encore à éclaircir. La synthèse des AGCM a seulement été décrite dans les cellules de la glande mammaire en lactation (Kumar et al., 1981; Libertini et al., 1978). Or, la ghréline n'est pas uniquement octanoylée chez les femelles post-partum, mais aussi chez les mâles, tout au long de la vie. Cela suggère fortement une origine alimentaire, mais les sources d'AGCM sont rares (produits laitiers, coco et palmiste) et ne sont consommées, chez les mammifères, que pendant la période d'allaitement (à l'exception faite de l'Homme qui consomme des produits laitiers au-delà de cette période). En outre, la faible quantité éventuellement consommée n'est pas stockée car les AGCM sont rapidement β -oxydés dans le foie, après ingestion. Or, la concentration en ghréline acylée se maintient à un niveau basal (non nul) et le pic de sécrétion apparaît avant les repas (Cummings et al., 2001), au moment

où les AGCM ne sont pas présents dans le tractus digestif. Le but de cette thèse était donc d'étudier l'origine et le métabolisme du C8:0 et de réévaluer ses effets physiologiques en y incluant l'impact sur l'octanoylation de la ghréline.

Synthèse des principaux résultats obtenus

Les résultats expérimentaux ont d'abord montré que la dose de C8:0 alimentaire, sous forme de trioctanoïne, a un effet direct sur l'enrichissement en C8:0 dans les cellules de l'estomac chez le rat ou le raton, que ce soit après un apport chronique de 6 semaines (Partie A) ou suite à l'ingestion d'une dose dans une émulsion lipidique (Partie B). Cet enrichissement spécifique de l'estomac suggérait donc une absorption directe, au niveau gastrique, après hydrolyse de la trioctanoïne. L'absorption gastrique du C8:0 marqué au carbone 13 a été démontrée par inhibition de la lipase préduodénale avec le BemPPOX et par quantification du ¹³C-C8:0 dans l'estomac par GC-MS (Partie B). Cependant, cette augmentation de la disponibilité dans les cellules gastriques n'a pas eu d'effet sur la concentration plasmatique de ghréline octanoylée, mesurée après la prise alimentaire (Parties A et B) ou plusieurs heures après, chez les animaux à jeun (Partie A). Même si cette absence d'effet n'est pas surprenante juste après le repas, elle l'est plus chez les rats à jeun et cela suggère des régulations autres que la disponibilité du substrat octanoyl-CoA (activité de la GOAT, sécrétion de la ghréline, stabilité de la forme acylée dans le plasma). La diminution de l'expression des ARNm de la préproghréline (PPG) et du signal observé par marquage immunohistochimique de la ghréline dans l'estomac sont en faveur d'une régulation négative de la synthèse de ce peptide. A l'inverse, un apport en C8:0 alimentaire diminue la concentration en ghréline non octanoylée dans le plasma, ce qui conduit également à diminuer la concentration en ghréline totale (Partie A et B) par des mécanismes de régulation que nous n'avons pas encore identifiés. La consommation chronique de C8:0 n'a pas d'effet sur la prise alimentaire des rats ni sur la prise de poids, ce qui est cohérent avec la stabilité de la concentration en ghréline octanoylée dans le plasma. Une augmentation de l'expression des ARNm d'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), régulée par la sécrétion de GH, a néanmoins été observée ainsi qu'une augmentation du diamètre moyen des adipocytes, dans les tissus adipeux sous-cutané et mésentérique sans que cela n'affecte la masse de tissus adipeux. Ces

effets peuvent être dus aux effets physiologiques de l'acide gras et/ou à la diminution de la ghréline non acylée (augmentation du ratio ghréline acylée/non acylée).

Questions soulevées et limites des expérimentations

Les résultats obtenus dans ce doctorat soulèvent plusieurs questions concernant le mécanisme d'entrée du C8:0 dans la muqueuse stomacale (passif ou facilité par des transporteurs) et le métabolisme de cet acide gras dans les cellules gastriques, notamment son stockage dans les triglycérides cellulaires, sa mobilisation et son activation en octanoyl-CoA par les ACSM (Medium-chain Acyl-CoA synthetase) afin d'être utilisé comme substrat par la GOAT. La régulation de cette enzyme en fonction de la disponibilité en C8:0 ou par d'autres facteurs (AGCL, hormone) doit également être clarifiée. D'autre part, le fait que l'absence de C8:0 dans les régimes contrôlés n'ait pas eu d'influence sur la concentration en ghréline octanoylée dans le plasma (Partie A) soutient l'hypothèse d'une synthèse *de novo* du C8:0, dans d'autres cellules que celles de la glande mammaire en lactation. Il est possible qu'une faible quantité de C8:0 soit produite par le microbiote. En effet, les bactéries intestinales sont capables de former des AGCC (acides acétique, propionique et butyrique) par fermentation des fibres alimentaires (Roy et al., 2006) et on peut supposer que des produits intermédiaires de la fermentation, les AGCM, sont formés en petite quantité. Cela n'a pas été décrit pour le C8:0, mais l'a été pour le C6:0 (Kenealy et al., 1995) qui peut aussi être utilisé par la GOAT.

Nous avons voulu démontrer la synthèse *de novo* du C8:0 et étudier son métabolisme dans les cellules gastriques, en mettant en place les cultures de cellules et d'explants d'estomacs de rats (Partie C). Des difficultés méthodologiques ont cependant été rencontrées, à cause d'une faible viabilité des cellules et de la diversité des types cellulaires dans l'estomac. Nous avons également été confrontés à des problèmes méthodologiques pour la mesure de l'activité de la GOAT recombinante de rat (difficulté de surexpression en cellules de mammifères, pas de formation d'octanoyl-CoA, temps de demi-vie de la ghréline octanoylée faible), qui aurait dû nous permettre d'étudier l'effet des acides gras sur la régulation de cette enzyme (Partie D). Même si ces modèles ne nous ont pas encore permis de répondre aux questions soulevées par les études *in vivo* (Partie A et B), ils sont désormais utilisables pour les expérimentations présentées dans les perspectives de cette thèse.

Une des limites de cette étude est l'absence de mesures des concentrations en ghréline octanoylée et non acylée dans les cellules de l'estomac et de l'intestin. En effet, les concentrations plasmatiques ont été quantifiées par dosages immunoenzymatiques après prélèvement du sang et préservation de la dégradation (par ajout d'un inhibiteur des estérases et acidification). Ces outils méthodologiques n'ont pas pu être transposés à la mesure de la concentration en ghréline octanoylée et non acylée dans les lysats cellulaires de tissus (estomac, intestin). La bibliographie montre d'ailleurs la difficulté de cette analyse. Des outils ont été développés par Nishi et *al.*, mais des doutes subsistent concernant la spécificité des anticorps pour différencier les différentes formes de la ghréline dans l'estomac. Dans notre étude, l'estomac reste donc un tissu peu caractérisé concernant les concentrations en ghréline octanoylée et non octanoylée. Il est ainsi difficile de conclure sur l'influence d'un apport chronique de C8:0 sur la sécrétion de ghréline dans le plasma. Une étude a, par exemple, observé que les cellules ghréline exprimaient à leur surface le récepteur FFAR 2 (Free Fatty Acid Receptor) sur lequel les AGCM libres peuvent se fixer, exerçant ainsi un effet inhibiteur sur la sécrétion de ghréline (Hass et al., 2010) et il est donc possible que la consommation chronique de trioctanoïne ait inhibé la sécrétion du peptide gastrique. Néanmoins, la diminution de l'expression des ARNm de la PPG et du marquage immunohistochimique de la ghréline dans la muqueuse oxyntique (Partie A) suggère que la baisse de la concentration en ghréline totale dans le plasma suite à un apport chronique en C8:0 pourrait bien être liée à une diminution de l'expression de la préproghréline.

Dans les expérimentations *in vivo* (Parties A et B), l'acide octanoïque a été administré aux rats sous forme de trioctanoïne. Or, dans les sources naturelles d'AGCM, le C8:0 est estérifié en position *sn*-3 des triglycérides de la matière grasse laitière et en positions *sn*-1 et 3 dans les huiles de coco et de palmiste, mais n'est pas présent en position *sn*-2. Dans les huiles synthétiques TCM, toutes les fonctions du glycérol sont estérifiées avec des AGCM. Le C8:0 en position *sn*-2 de la trioctanoïne n'est *a priori* pas hydrolysé par la lipase préduodénale, peu par lipase pancréatique et est donc probablement capté par les entérocytes sous forme de monoglycéride, puis en grande partie réestérifié et acheminé au niveau des tissus périphériques. Ainsi, il est probable que l'utilisation de trioctanoïne augmente la part du C8:0 qui échappe à la β -oxydation hépatique et atteint les autres organes (Swift et al., 1990). Il est

possible que l'utilisation de trioctanoïne ait favorisé les effets du C8:0 sur les tissus adipeux (augmentation du diamètre des adipocytes - Partie A) ou que cela ait légèrement modifié l'activité des lipases digestives (Partie B).

La consommation alimentaire et la prise de poids n'ont pas été modifiées par la dose de C8:0, même caricaturale (Partie A). Il n'est pas, pour autant, possible d'affirmer que la dose de C8:0 n'influe pas sur le comportement alimentaire, et c'est là une autre limite de notre étude. En effet, la fréquence des repas et la quantité d'aliment consommée par repas n'ont pas été mesurées. Or, ces paramètres semblent être modifiés par la ghréline. Une étude a ainsi montré que l'injection péritonéale d'inhibiteurs de la GOAT (GO-CoA-Tat) chez le rat induisait une diminution de la fréquence des repas (Teuffel et al., 2015). Ce dernier paramètre peut aussi être influencée par la consommation d'AGCM, en raison de la forte oxydation des lipides dans le foie (Jambor de Sousa et al., 2006; Langhans, 1996). D'autre part, la dose d'AGCM consommée pourrait aussi exercer un effet sur la prise alimentaire « hédonique » (motivée par le plaisir), puisque des études ont montré que la ghréline régule cette fonction (Egecioglu et al., 2010; Perello et al., 2015; Shimbara et al., 2004; Walker et al., 2012), notamment pour les aliments riches en lipides et en sel (Cai et al., 2013). Cependant, notre étude n'était pas conçue pour évaluer la consommation alimentaire hédonique.

Perspectives

Améliorations des outils méthodologiques

L'amélioration de certains de nos outils méthodologiques est envisagée à court terme. La mesure de la ghréline octanoylée avec le ^{13}C -C8:0 dans les échantillons d'estomacs de rats (Partie B) pourrait en particulier être réalisée par LC-MS-MS (chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse tandem), ce qui permettrait de quantifier la part d'acide octanoïque alimentaire directement utilisée pour l'acylation. Afin de protéger la ghréline acylée de la dégradation dans les tissus, ceux-ci seront broyés dans un tampon au pH acide additionné d'un inhibiteur des estérases. La mesure de l'activité GOAT native à partir de cellules d'estomac ou d'autres tissus exprimant l'enzyme, après récupération des microsomes, pourrait également être réalisée rapidement. L'utilisation des traceurs du C8:0 (^{13}C -C8:0, ^{14}C -C8:0 et alcyne-C8:0) disponibles au laboratoire devrait également permettre

de réaliser de nouvelles expérimentations, afin de compléter nos résultats. Une amélioration intéressante de la technique de click chemistry serait de remplacer la biotine (azido-biotine), utilisée pour marquer les protéines acylées, par un autre groupement ne se liant pas naturellement aux protéines. L'utilisation de matrice Matrigel® pour mettre en culture (3D) les cellules d'estomac de rats comme décrit récemment par Schlaermann et *al.* (2014) permettrait de mieux modéliser la muqueuse gastrique.

Utilisation de nouveaux outils

Il est aussi envisageable de mettre en place de nouveaux outils méthodologiques pour approfondir le sujet. De nouvelles lignées cellulaires, telles que les cellules MGN3-1 (mouse ghrelinoma 3-1), qui sont des cellules cancéreuses d'estomac exprimant la ghréline, la GOAT et la prohormone convertase PC1/3 (Iwakura et al., 2010) pourraient constituer un modèle pertinent pour l'étude de l'octanoylation. Les cellules MAC-t (Huynh et al., 1991) et BME-UV (Zavizion et al., 1996) qui sont des cellules épithéliales de glandes mammaires bovines immortalisées pourraient également être utilisées comme contrôle positif de la synthèse *de novo* du C8:0 et du métabolisme des AGCM. L'utilisation de souris KO GOAT^(-/-) ou ghréline^(-/-) permettrait par exemple d'étudier l'effet des AGCM, indépendamment de leur effet sur l'axe ghréline-GOAT. Des dosages immunoenzymatiques d'hormones impliquées dans la régulation de l'axe ghréline-GOAT (obestatine, sécrétine, α -MSH) ou dans l'homéostasie énergétique (CCK, PYY) pourraient rapidement être réalisés. La régulation de la concentration en ghréline octanoylée dans le plasma, grâce à des antagonistes de la GOAT (GO-CoA-Tat), est considérée comme un moyen thérapeutique prometteur pour limiter la consommation alimentaire et l'obésité (Teuffel et al., 2015; Yang et al., 2008b). On pourrait envisager de comparer les effets des GO-CoA-Tat avec les effets du BemPPOX (ou d'autres dérivés oxadiazol inhibant les lipases digestives) ou de l'Orlistat (inhibiteur commercial des lipases préduodénale et pancréatique) sur la régulation du comportement alimentaire (consommation alimentaire, fréquence des repas, taille des repas, prise de poids) chez des rats adultes.

Expérimentations envisagées

Plus concrètement, il est prévu que l'étude de l'absorption gastrique se poursuive dans le cadre d'une collaboration, initiée par l'EIPL, ayant pour objectif d'améliorer les connaissances concernant l'effet des acides gras, libérés par la lipolyse gastro-intestinale, sur la sécrétion des hormones du tractus digestif. Notre participation dans cette collaboration permettrait de poursuivre la caractérisation de l'absorption gastrique des AGCM et l'étude des effets de l'inhibition de la lipase préduodénale sur l'axe ghréline-GOAT. Pour compléter les résultats déjà obtenus (Partie B), il pourrait être intéressant de modifier certains paramètres de l'expérimentation, tel que le temps de digestion (avant la ponction intracardiaque), afin de suivre les variations de la concentration plasmatique en ghréline octanoylée et non acylée à plus long terme. Des contrôles négatifs supplémentaires sans lipides (solution de saccharose \pm BemPPOX) ou avec des lipides et de l'Orlistat peuvent être ajoutés pour mieux comprendre les rôles des lipides et de la lipase préduodénale sur la concentration de ghréline circulante. D'autre part, afin de quantifier plus précisément l'absorption gastrique, il serait pertinent de réaliser les expérimentations dans des cages métaboliques afin de mesurer la part de $^{13}\text{CO}_2$ rejeté, issue de la β -oxydation des acides gras marqués. L'éventuelle absorption gastrique du C6:0 et du C10:0 (marqués au carbone 13) pourrait aussi être mesurée de la même manière que pour le C8:0. Il serait intéressant de réaliser ces expérimentations avec des triglycérides hétérogènes, c'est-à-dire avec une molécule de C8:0 en position *sn*-3 (éventuellement aussi en *sn*-1) pour se rapprocher de la réalité physiologique, avec des mélanges d'AGCM (différents ratios C6:0, C8:0 et C10:0) ou de la matière grasse laitière. Des dosages immunoenzymatiques de la CCK et de l'obestatine dans le plasma pourraient également être réalisés.

Une autre expérimentation *in vivo* envisagée serait de nourrir des rats avec différentes doses d'alcyne-C8:0 sous forme libre ou estérifié (et éventuellement d'alcyne-C6:0 et -C10:0) avec ou sans BemPPOX, puis d'analyser les acides gras et les protéines acylées dans différents tissus (plasma, estomac, intestin, cœur, tissus adipeux ...) avec la technique de click chemistry, après différents temps de digestion. La toxicité de l'alcyne-C8:0, synthétisé au laboratoire et purifié par HPLC préparative, doit préalablement être testée. Cela permettrait d'observer pour la 1^{ère} fois l'acylation de protéines *in vivo*, de confirmer l'origine des acides

gras qui acylent la ghréline, d'observer l'existence d'autres protéines hexanoylées, octanoylées ou décanoylée et d'étudier la régulation de l'octanoylation, selon les autres nutriments ingérés (AGCL, glucides...) et l'âge des animaux.

Des expérimentations *in vitro*, utilisant les modèles d'étude mis en place pendant ce doctorat, pourraient également être réalisées. La culture des cellules d'estomac de rats devrait nous permettre d'étudier l'absorption, le métabolisme des AGCM (β -oxydation, stockage) en incubant les cellules avec les différents traceurs disponibles (^{13}C -C8:0, ^{14}C -C8:0 et alcyne-C8:0) et de répondre à la question d'une éventuelle synthèse de *novo* du C8:0 dans les cellules gastriques, en incubant celles-ci avec de l'acétate radiomarqué (Rioux et al., 2007). Cette expérimentation pourra aussi être réalisée avec la lignée gastrique MGN3-1 (mouse ghrelinoma 3-1). De plus, les cellules MAC-t (Huynh et al., 1991) et BME-UV (Zavizion et al., 1996), qui peuvent se différencier et entrer en lactation suite à l'addition de prolactine (1,5 à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et d'insuline (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dans le milieu, pourront être utilisées comme contrôle positif de la synthèse *de novo* des AGCM. L'étude de l'expression des ACSM (Medium-chain Acyl-CoA synthetase), nécessaires pour l'activation des AGCM en acyl-CoA, pourrait également être réalisée car cette étape semble limitante lors de la mesure d'activité de la GOAT, contrairement à l'activation d'autres acides gras tels que le C16:0 ou le C14:0 (Rioux et al., 2006),

Conclusion nutritionnelle

Un autre objectif de ce doctorat était de déterminer l'intérêt nutritionnel de substituer les AGCL dans l'alimentation par des AGCM et s'il existe une dose « optimale ». La substitution du C16:0 (6,3%, 4,2% et 1,6% de l'AET dans les régimes à 21% de l'AET en lipides; 13,5%, 9% et 3,4% pour les régimes à 45% de lipides) considéré comme athérogène, hypercholestérolémiant et hypertriglycéridémiant lorsqu'il est consommé à forte dose, par du C8:0 (0%, 1,7% et 4,4% de l'AET pour les régimes à 10 % de lipides ; 0%, 3,6% et 9,5% pour les régimes à 25 % de lipides) n'a pas eu d'effet sur les paramètres lipidiques circulants (cholestérolémie et triglycéridémie, à jeun ou non) ni sur la glycémie (à jeun ou non). Ainsi, l'apport en AGCM a eu un effet neutre comparé à un apport en C16:0, même lorsque ce dernier atteint 13,5% de l'AET (> ANC 2010). Dans un objectif d'application à la nutrition

humaine, il convient néanmoins de préciser les limites du modèle rat mâle Sprague Dawley (SD) pour l'étude de la cholestérolémie et de la triglycéridémie. Si le rat est un modèle intéressant pour étudier le métabolisme lipidique hépatique (réactions enzymatiques proches de celles de l'Homme), il n'est pas le meilleur modèle d'étude du métabolisme des lipoprotéines plasmatiques car il ne possède pas la CETP (Cholesterylester transfer protein) qui échange les triglycérides des VLDL ou LDL avec les esters de cholestérol des HDL (Harris, 1997). Chez le rat, le cholestérol est donc principalement transporté par les HDL et non pas par les LDL. Ainsi, le rapport cholestérol total/cholestérol HDL, considéré comme un marqueur de risque d'apparition des maladies cardiovasculaires chez l'Homme, n'est pas un bon marqueur chez le rat, et il vaut mieux lui préférer la cholestérolémie totale (Tholstrup, 2006).

En conclusion, l'impact de la dose d'acide octanoïque consommée est faible sur les paramètres mesurés, même pour des doses caricaturales, et l'effet des AGCM dans l'alimentation semble neutre. Aux doses auxquelles l'acide octanoïque est consommé chez l'homme (<0,5 % de l'AET) il est très probable qu'il n'y ait pas d'effet sur la concentration en ghréline acylée, d'après ce qu'on observe chez le rat mâle (en croissance), et donc pas de risque d'augmenter la prise alimentaire et la prise de poids. En revanche, la consommation d'acide octanoïque diminue la concentration en ghréline non acylée dans le plasma. Or, l'effet de cette forme non octanoylée, longtemps considérée comme inactive, n'est actuellement pas déterminé, mais fait l'objet de nombreux travaux de recherche (Chakrabarti, 2015; Granata, 2010; Tam et al., 2015; Tong et al., 2014).

Références

- ANSES, 2011. Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras: rapport d'expertise collective.
- Abrams, C.K., Hamosh, M., Hubbard, V.S., Dutta, S.K., and Hamosh, P. (1984). Lingual lipase in cystic fibrosis. Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency. *J. Clin. Invest.* *73*, 374–382.
- Abumrad, N., Harmon, C., and Ibrahimi, A. (1998). Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. *J. Lipid Res.* *39*, 2309–2318.
- Airhart, S., Cade, W.T., Jiang, H., Coggan, A.R., Racette, S.B., Korenblat, K., Spearie, C.A., Waller, S., O'Connor, R., Bashir, A., et al. (2015). A Diet Rich in Medium-chain Fatty Acids Improves Systolic Function and Alters the Lipidomic Profile in Patients with Type 2 Diabetes: a Pilot Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *jc.2015–3292*.
- Albarran-Zeckler, R.G., Sun, Y., and Smith, R.G. (2011). Physiological roles revealed by ghrelin and ghrelin receptor deficient mice. *Peptides* *32*, 2229–2235.
- Ali, Y.B., Verger, R., Carrière, F., Petry, S., Muller, G., and Abousalham, A. (2012). The molecular mechanism of human hormone-sensitive lipase inhibition by substituted 3-phenyl-5-alkoxy-1,3,4-oxadiazol-2-ones. *Biochimie* *94*, 137–145.
- Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Fraga, M.J., and Juárez, M. (1999). Fatty Acid Composition of Caprine Milk: Major, Branched-Chain, and Trans Fatty Acids. *J. Dairy Sci.* *82*, 878–884.
- Aloulou, A., Rodriguez, J.A., Fernandez, S., van Oosterhout, D., Puccinelli, D., and Carrière, F. (2006). Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochim. Biophys. Acta* *1761*, 995–1013.
- Álvarez-Castro, P., Pena, L., and Córdido, F. (2013). Ghrelin in obesity, physiological and pharmacological considerations. *Mini Rev. Med. Chem.* *13*, 541–552.
- Andersson, K., Chen, D., Mattsson, H., Sundler, F., and Håkanson, R. (1998). Physiological significance of ECL-cell histamine. *Yale J. Biol. Med.* *71*, 183–193.
- Andoh, A., Takaya, H., Araki, Y., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., and Bamba, T. (2000). Medium- and Long-Chain Fatty Acids Differentially Modulate Interleukin-8 Secretion in Human Fetal Intestinal Epithelial Cells. *J. Nutr.* *130*, 2636–2640.
- Andrews, Z.B., Liu, Z.-W., Wallingford, N., Erion, D.M., Borok, E., Friedman, J.M., Tschöp, M.H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G.I., et al. (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* *454*, 846–851.
- Angeloni, S.V., Glynn, N., Ambrosini, G., Garant, M.J., Higley, J.D., Suomi, S., and Hansen, B.C. (2004). Characterization of the rhesus monkey ghrelin gene and factors influencing ghrelin gene expression and fasting plasma levels. *Endocrinology* *145*, 2197–2205.
- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., et al. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 4753–4758.
- Armand, M., Borel, P., Pasquier, B., Dubois, C., Senft, M., Andre, M., Peyrot, J., Salducci, J., and Lairon, D. (1996). Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am. J. Physiol.* *271*, G172–G183.

- Arnes, L., Hill, J.T., Gross, S., Magnuson, M.A., and Sussel, L. (2012). Ghrelin expression in the mouse pancreas defines a unique multipotent progenitor population. *PLoS One* 7, e52026.
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., Makino, S., Fujimiya, M., Nijijima, A., Fujino, M.A., et al. (2001). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120, 337–345.
- Ashitani, J.-I., Matsumoto, N., and Nakazato, M. (2009). Effect of octanoic acid-rich formula on plasma ghrelin levels in cachectic patients with chronic respiratory disease. *Nutr. J.* 8, 25.
- Astrup, A., Dyerberg, J., Elwood, P., Hermansen, K., Hu, F.B., Jakobsen, M.U., Kok, F.J., Krauss, R.M., Lecerf, J.M., Legrand, P., et al. (2011). The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *Am J Clin Nutr* 93, 684–688.
- Aw, T.Y., and Grigor, M.R. (1980). Digestion and absorption of milk triacylglycerols in 14-day-old suckling rats. *J. Nutr.* 110, 2133–2140.
- Baatar, D., Patel, K., and Taub, D.D. (2011). The effects of ghrelin on inflammation and the immune system. *Mol. Cell. Endocrinol.* 340, 44–58.
- Baba, N., Bracco, E.F., and Hashim, S.A. (1987). Role of brown adipose tissue in thermogenesis induced by overfeeding a diet containing medium chain triglyceride. *Lipids* 22, 442–444.
- Babayan, V.K. (1987). Medium chain triglycerides and structured lipids. *Lipids* 22, 417–420.
- Bach, A.C., and Babayan, V.K. (1982). Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr* 36, 950–962.
- Bach, A., and Chanussot, F. (1980). Effects of medium- and long-chain triglyceride diets in the genetically obese Zucker rat. *J. Nutr.* 110, 686–696.
- Bach, A.C., Ingenbleek, Y., and Frey, A. (1996). The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *J Lipid Res* 37, 708–726.
- Baldanzi, G., Filigheddu, N., Cutrupi, S., Catapano, F., Bonisconi, S., Fubini, A., Malan, D., Baj, G., Granata, R., Broglio, F., et al. (2002). Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J. Cell Biol.* 159, 1029–1037.
- Ball, D.M.J. (1993). Parenteral nutrition in the critically ill: Use of a medium chain triglyceride emulsion. *Intensive Care Med.* 19, 89–95.
- Banks, W.A., Tschöp, M., Robinson, S.M., and Heiman, M.L. (2002). Extent and Direction of Ghrelin Transport Across the Blood-Brain Barrier Is Determined by Its Unique Primary Structure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 822–827.
- Barazzoni, R., Bosutti, A., Stebel, M., Cattin, M.R., Roder, E., Visintin, L., Cattin, L., Biolo, G., Zanetti, M., and Guarnieri, G. (2005). Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E228–E235.
- Baringhaus, K.-H., Mueller, G., Petry, S., and Schoenafinger, K. (2002). Substituierte 3-phenyl-5-alkoxy-1,3,4-oxdiazol-2-one (und) ihre verwendung zur hemmung der hormonsensitiven lipase.
- Barnett, B.P., Hwang, Y., Taylor, M.S., Kirchner, H., Pfluger, P.T., Bernard, V., Lin, Y.Y., Bowers, E.M., Mukherjee, C., Song, W.J., et al. (2010). Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science* 330, 1689–1692.
- Bays, H.E., González-Campoy, J.M., Bray, G.A., Kitabchi, A.E., Bergman, D.A., Schorr, A.B., Rodbard, H.W., and Henry, R.R. (2008). Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 6, 343–368.

- Beauchamp, E., Goenaga, D., Le Bloc'h, J., Catheline, D., Legrand, P., and Rioux, V. (2007). Myristic acid increases the activity of dihydroceramide Delta4-desaturase 1 through its N-terminal myristoylation. *Biochimie* 89, 1553–1561.
- Beauchamp, E., Rioux, V., and Legrand, P. (2009). Acide myristique: nouvelles fonctions de régulation et de signalisation. *Med Sci Paris* 25, 57–63.
- Bednarek, M.A., Feighner, S.D., Pong, S.S., McKee, K.K., Hreniuk, D.L., Silva, M.V., Warren, V.A., Howard, A.D., Van Der Ploeg, L.H., and Heck, J.V. (2000). Structure-function studies on the new growth hormone-releasing peptide, ghrelin: minimal sequence of ghrelin necessary for activation of growth hormone secretagogue receptor 1a. *J. Med. Chem.* 43, 4370–4376.
- Bennett, P.A., Thomas, G.B., Howard, A.D., Feighner, S.D., van der Ploeg, L.H., Smith, R.G., and Robinson, I.C. (1997). Hypothalamic growth hormone secretagogue-receptor (GHS-R) expression is regulated by growth hormone in the rat. *Endocrinology* 138, 4552–4557.
- Benzonana, G., and Desnuelle, P. (1965). Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol. Biol. Oxid.* 105, 121–136.
- Bernaodat, F., Frelet-Barrand, A., Pochon, N., Dementin, S., Hivin, P., Boutigny, S., Rioux, J.-B., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Richaud, P., et al. (2011). Heterologous Expression of Membrane Proteins: Choosing the Appropriate Host. *PLoS ONE* 6, e29191.
- Bernbäck, S., Hernell, O., and Bläckberg, L. (1987). Bovine pregastric lipase: a model for the human enzyme with respect to properties relevant to its site of action. *Biochim. Biophys. Acta* 922, 206–213.
- Berryman, D.E., Glad, C.A.M., List, E.O., and Johannsson, G. (2013). The GH/IGF-1 axis in obesity: pathophysiology and therapeutic considerations. *Nat. Rev. Endocrinol.* 9, 346–356.
- Bodmer, M.W., Angal, S., Yarranton, G.T., Harris, T.J., Lyons, A., King, D.J., Pieroni, G., Riviere, C., Verger, R., and Lowe, P.A. (1987). Molecular cloning of a human gastric lipase and expression of the enzyme in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 909, 237–244.
- Bodosi, B., Gardi, J., Hajdu, I., Szentirmai, E., Obal, F., and Krueger, J.M. (2004). Rhythms of ghrelin, leptin, and sleep in rats: effects of the normal diurnal cycle, restricted feeding, and sleep deprivation. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R1071–R1079.
- Bougnères, P.F., Castaño, L., Rocchiccioli, F., Gia, H.P., Leluyer, B., and Ferré, P. (1989). Medium-chain fatty acids increase glucose production in normal and low birth weight newborns. *Am. J. Physiol.* 256, E692–E697.
- Bourque, C., St-Onge, M.-P., Papamandjaris, A.A., Cohn, J.S., and Jones, P.J.H. (2003). Consumption of an oil composed of medium chain triacylglycerols, phytosterols, and N-3 fatty acids improves cardiovascular risk profile in overweight women. *Metabolism.* 52, 771–777.
- Bowers, C.Y., Momany, F., Reynolds, G.A., Chang, D., Hong, A., and Chang, K. (1980). Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro. *Endocrinology* 106, 663–667.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
- Briggs, D.I., and Andrews, Z.B. (2011). A recent update on the role of ghrelin in glucose homeostasis. *Curr. Diabetes Rev.* 7, 201–207.
- Broglio, F., Benso, A., Gottero, C., Prodam, F., Gauna, C., Filtri, L., Arvat, E., van der Lely, A.J., Deghenghi, R., and Ghigo, E. (2003). Non-acylated ghrelin does not possess the pituitary and pancreatic endocrine activity of acylated ghrelin in humans. *J. Endocrinol. Invest.* 26, 192–196.

- Buscaïl, L., and Carrière, F. (2010). Physiopathologie de l'insuffisance pancréatique exocrine et ses implications thérapeutiques. *Hépatogastro-Oncol. Dig.* *17*, 135–144.
- Caggiula, A.W., and Mustad, V.A. (1997). Effects of dietary fat and fatty acids on coronary artery disease risk and total and lipoprotein cholesterol concentrations: epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* *65*, 1597S – 1610S.
- Cai, H., Cong, W.-N., Daimon, C.M., Wang, R., Tschöp, M.H., Sévigny, J., Martin, B., and Maudsley, S. (2013). Altered lipid and salt taste responsivity in ghrelin and GOAT null mice. *PLoS One* *8*, e76553.
- Caliari, S., Benini, L., Sembenini, C., Gregori, B., Carnielli, V., and Vantini, I. (1996). Medium-chain triglyceride absorption in patients with pancreatic insufficiency. *Scand. J. Gastroenterol.* *31*, 90–94.
- Cao, H., Gerhold, K., Mayers, J.R., Wiest, M.M., Watkins, S.M., and Hotamisligil, G.S. (2008). Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism. *Cell* *134*, 933–944.
- Carlson, S.J., Nandivada, P., Chang, M.I., Mitchell, P.D., O'Loughlin, A., Cowan, E., Gura, K.M., Nose, V., Bistrrian, B.R., and Puder, M. (2015). The addition of medium-chain triglycerides to a purified fish oil-based diet alters inflammatory profiles in mice. *Metabolism*. *64*, 274–282.
- Carnielli, V.P., Sulkers, E.J., Moretti, C., Wattimena, J.L., van Goudoever, J.B., Degenhart, H.J., Zacchello, F., and Sauer, P.J. (1994). Conversion of octanoic acid into long-chain saturated fatty acids in premature infants fed a formula containing medium-chain triglycerides. *Metabolism*. *43*, 1287–1292.
- Carnielli, V.P., Rossi, K., Badon, T., Gregori, B., Verlato, G., Orzali, A., and Zacchello, F. (1996). Medium-chain triacylglycerols in formulas for preterm infants: effect on plasma lipids, circulating concentrations of medium-chain fatty acids, and essential fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* *64*, 152–158.
- Carrière, F., Moreau, H., Raphel, V., Laugier, R., Benicourt, C., Junien, J.L., and Verger, R. (1991). Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase. *Eur. J. Biochem. FEBS* *202*, 75–83.
- Carrière, F., Barrowman, J.A., Verger, R., and Laugier, R. (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* *105*, 876–888.
- Carrière, F., Laugier, R., Barrowman, J.A., Douchet, I., Priymenko, N., and Verger, R. (1993). Gastric and pancreatic lipase levels during a test meal in dogs. *Scand. J. Gastroenterol.* *28*, 443–454.
- Carrière, F., Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., Laugier, R., and Verger, R. (1997). In vivo and in vitro studies on the stereoselective hydrolysis of tri- and diglycerides by gastric and pancreatic lipases. *Bioorg. Med. Chem.* *5*, 429–435.
- Carrière, F., Renou, C., Lopez, V., De Caro, J., Ferrato, F., Lengsfeld, H., De Caro, A., Laugier, R., and Verger, R. (2000). The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals. *Gastroenterology* *119*, 949–960.
- Carrière, F., Grandval, P., Renou, C., Palomba, A., Priéri, F., Giallo, J., Henniges, F., Sander-Struckmeier, S., and Laugier, R. (2005). Quantitative study of digestive enzyme secretion and gastrointestinal lipolysis in chronic pancreatitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *3*, 28–38.
- Castaneda, T.R., Tong, J., Datta, R., Culler, M., and Tschöp, M.H. (2010). Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front. Neuroendocrinol.* *31*, 44–60.
- Cater, N.B., Heller, H.J., and Denke, M.A. (1997). Comparison of the effects of medium-chain triacylglycerols, palm oil, and high oleic acid sunflower oil on plasma triacylglycerol fatty acids and lipid and lipoprotein concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* *65*, 41–45.
- Chahinian, H., Snabe, T., Attias, C., Fojan, P., Petersen, S.B., and Carrière, F. (2006). How gastric lipase, an interfacial enzyme with a Ser-His-Asp catalytic triad, acts optimally at acidic pH. *Biochemistry (Mosc.)* *45*, 993–1001.
- Chakrabarti, S. (2015). Unacylated Ghrelin: A Gut-Limb Connection. *Diabetes* *64*, 1097–1098.

- Chartrel, N., Alvear-Perez, R., Leprince, J., Iturrioz, X., Goazigo, A.R.-L., Audinot, V., Chomarat, P., Coge, F., Nosjean, O., Rodriguez, M., et al. (2007). Comment on “Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin’s Effects on Food Intake.” *Science* *315*, 766–766.
- Chen, W., and Enriori, P.J. (2014). Ghrelin: a journey from GH secretagogue to regulator of metabolism. *Transl. Gastrointest. Cancer* *4*, 14–27.
- Chen, C.-Y., Lee, W.-J., Chong, K., Lee, S.-D., and Liao, Y.-D. (2012). Impact of intracerebroventricular obestatin on plasma acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 levels, and on gastric emptying in rats. *Mol. Med. Rep.* *6*, 191–196.
- Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Weingarth, D.T., Adams, J.R., Frazier, E.G., Shen, Z., Marsh, D.J., Feighner, S.D., Guan, X.-M., et al. (2004). Orexigenic Action of Peripheral Ghrelin Is Mediated by Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein. *Endocrinology* *145*, 2607–2612.
- Chia, D.J. (2014). MINIREVIEW: Mechanisms of growth hormone-mediated gene regulation. *Mol. Endocrinol.*
- Chorny, A., Anderson, P., Gonzalez-Rey, E., and Delgado, M. (2008). Ghrelin Protects against Experimental Sepsis by Inhibiting High-Mobility Group Box 1 Release and by Killing Bacteria. *J. Immunol.* *180*, 8369–8377.
- Christensen, E., Hagve, T.A., Gronn, M., and Christophersen, B.O. (1989). Beta-oxidation of medium chain (C8-C14) fatty acids studied in isolated liver cells. *Biochim Biophys Acta* *1004*, 187–195.
- Christensen, E., Grønn, M., Hagve, T.A., and Christophersen, B.O. (1991). Omega-oxidation of fatty acids studied in isolated liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1081*, 167–173.
- Chuang, J.-C., Sakata, I., Kohno, D., Perello, M., Osborne-Lawrence, S., Repa, J.J., and Zigman, J.M. (2011). Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *25*, 1600–1611.
- Clark, S.B., Brause, B., and Holt, P.R. (1969). Lipolysis and Absorption of Fat in the Rat Stomach. *Gastroenterology* *56*, 214–222.
- Colquhoun, D.R., Lyashkov, A.E., Ubaida Mohien, C., Aquino, V.N., Bullock, B.T., Dinglasan, R.R., Agnew, B.J., and Graham, D.R.M. (2015). Bioorthogonal mimetics of palmitoyl-CoA and myristoyl-CoA and their subsequent isolation by click chemistry and characterization by mass spectrometry reveal novel acylated host-proteins modified by HIV-1 infection. *Proteomics* *15*, 2066–2077.
- Crozier, G., Bois-Joyeux, B., Chanez, M., Girard, J., and Peret, J. (1987). Metabolic effects induced by long-term feeding of medium-chain triglycerides in the rat. *Metabolism* *36*, 807–814.
- Cruz-Hernandez, C., Oliveira, M., Pescia, G., Moulin, J., Masserey-Elmelegy, I., Dionisi, F., and Destailats, F. (2010). Lipase inhibitor orlistat decreases incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in rat tissues. *Nutr. Res.* *30*, 134–140.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., and Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* *50*, 1714–1719.
- Cummings, D.E., Foster-Schubert, K.E., and Overduin, J. (2005). Ghrelin and Energy Balance: Focus on Current Controversies. *Curr. Drug Targets* *6*, 153–169.
- Cunnane, S.C., and Anderson, M.J. (1997). The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat. *J Nutr* *127*, 146–152.
- Darling, J.E., Prybolsky, E.P., Sieburg, M., and Hougland, J.L. (2013). A fluorescent peptide substrate facilitates investigation of ghrelin recognition and acylation by ghrelin O-acyltransferase. *Anal. Biochem.* *437*, 68–76.
- Darling, J.E., Zhao, F., Loftus, R.J., Patton, L.M., Gibbs, R.A., and Hougland, J.L. (2015). Structure–Activity Analysis of Human Ghrelin O-Acyltransferase Reveals Chemical Determinants of Ghrelin Selectivity and Acyl Group Recognition. *Biochemistry (Mosc.)* *54*, 1100–1110.

- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M.S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* *141*, 4255–4261.
- Davies, J.S., Kotokorpi, P., Eccles, S.R., Barnes, S.K., Tokarczuk, P.F., Allen, S.K., Whitworth, H.S., Guschina, I.A., Evans, B.A.J., Mode, A., et al. (2009). Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *23*, 914–924.
- De Caro, J., Carrière, F., Barboni, P., Giller, T., Verger, R., and De Caro, A. (1998). Pancreatic lipase-related protein 1 (PLRP1) is present in the pancreatic juice of several species. *Biochim. Biophys. Acta* *1387*, 331–341.
- Degen, L., Drewe, J., Piccoli, F., Gräni, K., Oesch, S., Bunea, R., D'Amato, M., and Beglinger, C. (2007). Effect of CCK-1 receptor blockade on ghrelin and PYY secretion in men. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *292*, R1391–R1399.
- Dehlin, E., Liu, J., Yun, S.H., Fox, E., Snyder, S., Gineste, C., Willingham, L., Geysen, M., Gaylenn, B.D., and Sando, J.J. (2008). Regulation of ghrelin structure and membrane binding by phosphorylation. *Peptides* *29*, 904–911.
- Delhanty, P.J., Neggers, S.J., and van der Lely, A.J. (2013). Des-acyl ghrelin: a metabolically active peptide. *Endocr. Dev.* *25*, 112–121.
- Delhanty, P.J.D., Huisman, M., Julien, M., Mouchain, K., Brune, P., Themmen, A.P.N., Abribat, T., and van der Lely, A.J. (2015). The acylated (AG) to unacylated (UAG) ghrelin ratio in esterase inhibitor-treated blood is higher than previously described. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *82*, 142–146.
- Delplanque, B., Du, Q., Agnani, G., Le Ruyet, P., and Martin, J.C. (2013). A dairy fat matrix providing alpha-linolenic acid (ALA) is better than a vegetable fat mixture to increase brain DHA accretion in young rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fat. Acids* *88*, 115–120.
- Delporte, C. (2013). Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica* *2013*, 518909.
- DeNigris, S.J., Hamosh, M., Kasbekar, D.K., Fink, C.S., Lee, T.C., and Hamosh, P. (1985). Secretion of human gastric lipase from dispersed gastric glands. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* *836*, 67–72.
- Desbois, A.P., and Smith, V.J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *85*, 1629–1642.
- De Vriese, C., Hacquebard, M., Gregoire, F., Carpentier, Y., and Delporte, C. (2007). Ghrelin Interacts with Human Plasma Lipoproteins. *Endocrinology* *148*, 2355–2362.
- Dezaki, K. (2013). Ghrelin function in insulin release and glucose metabolism. *Endocr. Dev.* *25*, 135–143.
- Dietrich, L.E., and Ungermann, C. (2004). On the mechanism of protein palmitoylation. *EMBO Rep* *5*, 1053–1057.
- Docherty, A.J., Bodmer, M.W., Angal, S., Verger, R., Riviere, C., Lowe, P.A., Lyons, A., Emtage, J.S., and Harris, T.J. (1985). Molecular cloning and nucleotide sequence of rat lingual lipase cDNA. *Nucleic Acids Res.* *13*, 1891–1903.
- Dohme, F., Machmüller, A., Wasserfallen, A., and Kreuzer, M. (2001). Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. *Lett. Appl. Microbiol.* *32*, 47–51.
- Dornonville de la Cour, C., Björkqvist, M., Sandvik, A.K., Bakke, I., Zhao, C.M., Chen, D., and Håkanson, R. (2001). A-like cells in the rat stomach contain ghrelin and do not operate under gastrin control. *Regul. Pept.* *99*, 141–150.
- Du, Q., Martin, J.-C., Agnani, G., Pages, N., Leruyet, P., Carayon, P., and Delplanque, B. (2012). Dairy fat blends high in α -linolenic acid are superior to n-3 fatty-acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brains of young rats. *J. Nutr. Biochem.* *23*, 1573–1582.

- Duarte, J.A.G., Carvalho, F., Pearson, M., Horton, J.D., Browning, J.D., Jones, J.G., and Burgess, S.C. (2014). A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice. *J. Lipid Res.* *55*, 2541–2553.
- Ebert, D., Haller, R.G., and Walton, M.E. (2003). Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 5928–5935.
- Eckel, R.H., Hanson, A.S., Chen, A.Y., Berman, J.N., Yost, T.J., and Brass, E.P. (1992). Dietary substitution of medium-chain triglycerides improves insulin-mediated glucose metabolism in NIDDM subjects. *Diabetes* *41*, 641–647.
- Egecioglu, E., Jerlhag, E., Salomé, N., Skibicka, K.P., Haage, D., Bohlooly-Y, M., Andersson, D., Bjursell, M., Perrissoud, D., Engel, J.A., et al. (2010). Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents. *Addict. Biol.* *15*, 304–311.
- Egelrud, T., Ollvecrona, T., and Helander, H. (1971). Studies on Gastric Absorption of Lipids in the Suckling Rat. *Scand. J. Gastroenterol.* *6*, 329–333.
- Ellrichmann, M., Kapelle, M., Ritter, P.R., Holst, J.J., Herzig, K.-H., Schmidt, W.E., Schmitz, F., and Meier, J.J. (2008). Orlistat inhibition of intestinal lipase acutely increases appetite and attenuates postprandial glucagon-like peptide-1-(7-36)-amide-1, cholecystokinin, and peptide YY concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *93*, 3995–3998.
- Erlanson, C., and Borgström, B. (1970). Tributyrine as a substrate for determination of lipase activity of pancreatic juice and small intestinal content. *Scand. J. Gastroenterol.* *5*, 293–295.
- Eschwege, E., Basdevant, A., Crine, A., Moisan, C., and Charles, M.-A. (2015). Type 2 diabetes mellitus in France in 2012: Results from the ObEpi survey. *Diabetes Metab.* *41*, 55–61.
- Ezanno, H., Beauchamp, E., Lemarié, F., Legrand, P., and Rioux, V. (2013). L'acylation des protéines: une fonction cellulaire importante des acides gras saturés. *Nutr Clin Metab* *27*, 10–19.
- Ezanno, H., Beauchamp, E., Catheline, D., Legrand, P., and Rioux, V. (2014). Beneficial impact of a mix of dairy fat with rapeseed oil on n-6 and n-3 PUFA metabolism in the rat: A small enrichment in dietary alpha-linolenic acid greatly increases its conversion to DHA in the liver. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* n/a – n/a.
- Farazi, T.A., Waksman, G., and Gordon, J.I. (2001). The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* *276*, 39501–39504.
- Fernando, W.M. a. D.B., Martins, I.J., Goozee, K.G., Brennan, C.S., Jayasena, V., and Martins, R.N. (2015). The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. *Br. J. Nutr.* *114*, 1–14.
- Fernando-Warnakulasuriya, G.J., Stagers, J.E., Frost, S.C., and Wells, M.A. (1981). Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. I. Fatty acid composition and concentrations of major lipid components. *J. Lipid Res.* *22*, 668–674.
- Ferré, P., Satabin, P., Decaux, J.F., Escriva, F., and Girard, J. (1983). Development and regulation of ketogenesis in hepatocytes isolated from newborn rats. *Biochem. J.* *214*, 937–942.
- Ferreira, L., Lisenko, K., Barros, B., Zangeronimo, M., Pereira, L., and Sousa, R. (2014). Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: a systematic review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* *98*, 1–8.
- Field, R.B., and Scow, R.O. (1983). Purification and characterization of rat lingual lipase. *J. Biol. Chem.* *258*, 14563–14569.
- Folwaczny, C., Chang, J.K., and Tschöp, M. (2001). Ghrelin and motilin: two sides of one coin? *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* *144*, R1–R3.

- Friedman, M.I., Edens, N.K., and Ramirez, I. (1983). Differential effects of medium- and long-chain triglycerides on food intake of normal and diabetic rats. *Physiol. Behav.* *31*, 851–855.
- Fukumori, R., Sugino, T., Shingu, H., Moriya, N., Kobayashi, H., Hasegawa, Y., Kojima, M., Kangawa, K., Obitsu, T., Kushibiki, S., et al. (2013). Ingestion of medium chain fatty acids by lactating dairy cows increases concentrations of plasma ghrelin. *Domest. Anim. Endocrinol.* *45*, 216–223.
- Gagnon, J. (2012). Insulin and norepinephrine regulate ghrelin secretion from a rat primary stomach cell culture. *Endocrinology* *153*, 3646–3656.
- Galbraith, H., Miller, T.B., Paton, A.M., and Thompson, J.K. (1971). Antibacterial Activity of Long Chain Fatty Acids and the Reversal with Calcium, Magnesium, Ergocalciferol and Cholesterol. *J. Appl. Bacteriol.* *34*, 803–813.
- Gano, L.B., Patel, M., and Rho, J.M. (2014). Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases. *J. Lipid Res.* *55*, 2211–2228.
- Gargouri, Y., Pieroni, G., Rivière, C., Lowe, P.A., Saunière, J.F., Sarda, L., and Verger, R. (1986a). Importance of human gastric lipase for intestinal lipolysis: an in vitro study. *Biochim. Biophys. Acta* *879*, 419–423.
- Gargouri, Y., Pieroni, G., Riviere, C., Sauniere, J.F., Lowe, P.A., Sarda, L., and Verger, R. (1986b). Kinetic assay of human gastric lipase on short- and long-chain triacylglycerol emulsions. *Gastroenterology* *91*, 919–925.
- Gargouri, Y., Moreau, H., and Verger, R. (1989). Gastric lipases: biochemical and physiological studies. *Biochim. Biophys. Acta* *1006*, 255–271.
- Gargouri, Y., Ransac, S., and Verger, R. (1997). Covalent inhibition of digestive lipases: an in vitro study. *Biochim. Biophys. Acta* *1344*, 6–37.
- Garner, A.L., and Janda, K.D. (2010). cat-ELCCA: a robust method to monitor the fatty acid acyltransferase activity of ghrelin O-acyltransferase (GOAT). *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *49*, 9630–9634.
- Garner, A.L., and Janda, K.D. (2011). A small molecule antagonist of ghrelin O-acyltransferase (GOAT). *Chem. Commun.* *47*, 7512–7514.
- Geliebter, A., Torbay, N., Bracco, E.F., Hashim, S.A., and Van Itallie, T.B. (1983). Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. *Am J Clin Nutr* *37*, 1–4.
- Geng, S., Zhu, W., Xie, C., Li, X., Wu, J., Liang, Z., Xie, W., Zhu, J., Huang, C., Zhu, M., et al. (2015). Medium-chain triglyceride ameliorates insulin resistance and inflammation in high fat diet-induced obese mice. *Eur. J. Nutr.*
- Ghigo, E., Broglio, F., Arvat, E., Maccario, M., Papotti, M., and Muccioli, G. (2005). Ghrelin: more than a natural GH secretagogue and/or an orexigenic factor. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *62*, 1–17.
- Gillum, M.P., Zhang, D., Zhang, X.-M., Erion, D.M., Jamison, R.A., Choi, C., Dong, J., Shanabrough, M., Duenas, H.R., Frederick, D.W., et al. (2008). N-acylphosphatidylethanolamine, a gut- derived circulating factor induced by fat ingestion, inhibits food intake. *Cell* *135*, 813–824.
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A.B., and Korbonits, M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 2988.
- Goebel-Stengel, M., Hofmann, T., Elbelt, U., Teuffel, P., Ahnis, A., Kobelt, P., Lambrecht, N.W.G., Klapp, B.F., and Stengel, A. (2013). The ghrelin activating enzyme ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) is present in human plasma and expressed dependent on body mass index. *Peptides* *43*, 13–19.

- Gong, Z., Yoshimura, M., Aizawa, S., Kurotani, R., Zigman, J.M., Sakai, T., and Sakata, I. (2014). G protein-coupled receptor 120 signaling regulates ghrelin secretion in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *306*, E28–E35.
- Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., and Delgado, M. (2006). Therapeutic Action of Ghrelin in a Mouse Model of Colitis. *Gastroenterology* *130*, 1707–1720.
- Gooden, J.M., and Lascelles, A.K. (1973). Relative importance of pancreatic lipase and pregastric esterase on lipid absorption in calves 1-2 weeks of age. *Aust. J. Biol. Sci.* *26*, 625–633.
- Gosmain, Y., Dif, N., Berbe, V., Loizon, E., Rieusset, J., Vidal, H., and Lefai, E. (2005). Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J. Lipid Res.* *46*, 697–705.
- Granata, R. (2010). Unacylated ghrelin: a metabolic hormone.
- Griffin, M.J. (2004). Insulin regulation of fatty acid synthase gene transcription: roles of USF and SREBP-1c. *IUBMB Life* *56*, 595–600.
- Grönberg, M., Tsolakis, A.V., Magnusson, L., Janson, E.T., and Saras, J. (2008). Distribution of Obestatin and Ghrelin in Human Tissues: Immunoreactive Cells in the Gastrointestinal Tract, Pancreas, and Mammary Glands. *J. Histochem. Cytochem.* *56*, 793–801.
- Guan, X.M., Yu, H., Palyha, O.C., McKee, K.K., Feighner, S.D., Sirinathsinghji, D.J., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., and Howard, A.D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *48*, 23–29.
- Guillot, E., Legrand, P., and Lemarchal, P. (1997). Octanoate Metabolism in Primary Culture of Chicken Hepatocytes: Evidence for High-Capacity Octanoate Esterification. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* *118*, 249–256.
- Guillou, H., Martin, P., Jan, S., D'Andrea, S., Roulet, A., Catheline, D., Rioux, V., Pineau, T., and Legrand, P. (2002). Comparative effect of fenofibrate on hepatic desaturases in wild-type and peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *Lipids* *37*, 981–989.
- Gutierrez, J.A., Solenberg, P.J., Perkins, D.R., Willency, J.A., Knierman, M.D., Jin, Z., Witcher, D.R., Luo, S., Onyia, J.E., and Hale, J.E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 6320–6325.
- Hamosh, M., and Hand, A.R. (1978). Development of secretory activity in serous cells of the rat tongue. *Dev. Biol.* *65*, 100–113.
- Hamosh, M., and Scow, R.O. (1973). Lingual Lipase and Its Role in the Digestion of Dietary Lipid. *J. Clin. Invest.* *52*, 88–95.
- Hamosh, M., Ganot, D., and Hamosh, P. (1979). Rat lingual lipase. Characteristics of enzyme activity. *J. Biol. Chem.* *254*, 12121–12125.
- Hamosh, M., Scanlon, J.W., Ganot, D., Likel, M., Scanlon, K.B., and Hamosh, P. (1981). Fat digestion in the newborn. Characterization of lipase in gastric aspirates of premature and term infants. *J. Clin. Invest.* *67*, 838–846.
- Han, J., Farmer, S.R., Kirkland, J.L., Corkey, B.E., Yoon, R., Pirtskhalava, T., Ido, Y., and Guo, W. (2002). Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr* *132*, 904–910.
- Han, J., Hamilton, J.A., Kirkland, J.L., Corkey, B.E., and Guo, W. (2003). Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obes Res* *11*, 734–744.

- Han, J.R., Deng, B., Sun, J., Chen, C.G., Corkey, B.E., Kirkland, J.L., Ma, J., and Guo, W. (2007). Effects of dietary medium-chain triglyceride on weight loss and insulin sensitivity in a group of moderately overweight free-living type 2 diabetic Chinese subjects. *Metabolism*. 56, 985–991.
- Harris, W.S. (1997). n-3 fatty acids and serum lipoproteins: animal studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 1611S – 1616S.
- Hashim, S.A., and Tantibhedyangkul, P. (1987). Medium chain triglyceride in early life: effects on growth of adipose tissue. *Lipids* 22, 429–434.
- Hass, N., Schwarzenbacher, K., and Breer, H. (2010). T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. *Cell Tissue Res.* 339, 493–504.
- Hassouna, R., Zizzari, P., and Tolle, V. (2010). The ghrelin/obestatin balance in the physiological and pathological control of growth hormone secretion, body composition and food intake. *J. Neuroendocrinol.* 22, 793–804.
- Hassouna, R., Zizzari, P., Viltart, O., Yang, S.-K., Gardette, R., Videau, C., Badoer, E., Epelbaum, J., and Tolle, V. (2012). A Natural Variant of Obestatin, Q90L, Inhibits Ghrelin's Action on Food Intake and GH Secretion and Targets NPY and GHRH Neurons in Mice. *PLoS ONE* 7, e51135.
- Hataya, Y., Akamizu, T., Takaya, K., Kanamoto, N., Ariyasu, H., Saijo, M., Moriyama, K., Shimatsu, A., Kojima, M., Kangawa, K., et al. (2001). A Low Dose of Ghrelin Stimulates Growth Hormone (GH) Release Synergistically with GH-Releasing Hormone in Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 4552–4552.
- Hauptman, J.B., Jeunet, F.S., and Hartmann, D. (1992). Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin). *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 309S – 313S.
- Hegsted, D.M., McGandy, R.B., Myers, M.L., and Stare, F.J. (1965). Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 17, 281–295.
- Helander, H.F. (1970). Lipolysis and lipid absorption in the stomach of the suckling rat. *Gastroenterology* 59, 22–35.
- Heppner, K.M., and Tong, J. (2014). Mechanisms in endocrinology: regulation of glucose metabolism by the ghrelin system: multiple players and multiple actions. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 171, R21–R32.
- Higgins, S.C., Gueorguiev, M., and Korbonits, M. (2007). Ghrelin, the peripheral hunger hormone. *Ann. Med.* 39, 116–136.
- Hill, J.O., Peters, J.C., Yang, D., Sharp, T., Kaler, M., Abumrad, N.N., and Greene, H.L. (1989). Thermogenesis in humans during overfeeding with medium-chain triglycerides. *Metabolism* 38, 641–648.
- Hill, J.O., Peters, J.C., Swift, L.L., Yang, D., Sharp, T., Abumrad, N., and Greene, H.L. (1990). Changes in blood lipids during six days of overfeeding with medium or long chain triglycerides. *J. Lipid Res.* 31, 407–416.
- Hill, J.O., Hauptman, J., Anderson, J.W., Fujioka, K., O'Neil, P.M., Smith, D.K., Zavoral, J.H., and Aronne, L.J. (1999). Orlistat, a lipase inhibitor, for weight maintenance after conventional dieting: a 1-y study. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1108–1116.
- Holmes, E., Davies, I., Lowe, G., and Ranganath, L.R. (2009). Circulating ghrelin exists in both lipoprotein bound and free forms. *Ann. Clin. Biochem.* 46, 514–516.
- Holst, B., Egerod, K.L., Schild, E., Vickers, S.P., Cheetham, S., Gerlach, L.-O., Storjohann, L., Stidsen, C.E., Jones, R., Beck-Sickinger, A.G., et al. (2007). GPR39 Signaling Is Stimulated by Zinc Ions But Not by Obestatin. *Endocrinology* 148, 13–20.
- Holt, S. (1981). Observations on the relation between alcohol absorption and the rate of gastric emptying. *Can. Med. Assoc. J.* 124, 267–297.

- Hoshimoto, A., Suzuki, Y., Katsuno, T., Nakajima, H., and Saito, Y. (2002). Caprylic acid and medium-chain triglycerides inhibit IL-8 gene transcription in Caco-2 cells: comparison with the potent histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Br. J. Pharmacol.* *136*, 280–286.
- Hosoda, H., and Kangawa, K. (2012). Standard sample collections for blood ghrelin measurements. *Methods Enzymol.* *514*, 113–126.
- Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (2000a). Purification and characterization of rat des-Gln14-Ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor. *J. Biol. Chem.* *275*, 21995–22000.
- Hosoda, H., Kojima, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (2000b). Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *279*, 909–913.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P.A., Rosenblum, C.I., Hamelin, M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., et al. (1996). A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* *273*, 974–977.
- Hu, F.B., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Ascherio, A., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Hennekens, C.H., and Willett, W.C. (1999). Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. *Am J Clin Nutr* *70*, 1001–1008.
- Huang, C.B., Altimova, Y., Myers, T.M., and Ebersole, J.L. (2011). Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch. Oral Biol.* *56*, 650–654.
- Hussain, M.M. (2014). Intestinal Lipid Absorption and Lipoprotein Formation. *Curr. Opin. Lipidol.* *25*, 200–206.
- Huynh, H.T., Robitaille, G., and Turner, J.D. (1991). Establishment of bovine mammary epithelial cells (MAC-T): An in vitro model for bovine lactation. *Exp. Cell Res.* *197*, 191–199.
- Ilcol, Y.O., and Hizli, B. (2007). Active and total ghrelin concentrations increase in breast milk during lactation. *Acta Paediatrica* *96*, 1632–1639.
- Inhoff, T., Mönnikes, H., Noetzel, S., Stengel, A., Goebel, M., Dinh, Q.T., Riedl, A., Bannert, N., Wisser, A.-S., Wiedenmann, B., et al. (2008). Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* *29*, 2159–2168.
- Iqbal, J., and Hussain, M.M. (2009). Intestinal lipid absorption. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *296*, E1183–E1194.
- Isaacs, C.E., Kim, K.S., and Thormar, H. (1994). Inactivation of enveloped viruses in human bodily fluids by purified lipids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *724*, 457–464.
- Isgaard, J., Barlund, A., and Johansson, I. (2008). Cardiovascular effects of ghrelin and growth hormone secretagogues. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* *8*, 133–137.
- Iwakura, H., Li, Y., Ariyasu, H., Hosoda, H., Kanamoto, N., Bando, M., Yamada, G., Hosoda, K., Nakao, K., Kangawa, K., et al. (2010). Establishment of a novel ghrelin-producing cell line. *Endocrinology* *151*, 2940–2945.
- Jambor de Sousa, U.L., Arnold, M., Langhans, W., Geary, N., and Leonhardt, M. (2006). Caprylic acid infusion acts in the liver to decrease food intake in rats. *Physiol. Behav.* *87*, 388–395.
- Janssen, S., and Depoortere, I. (2013). Nutrient sensing in the gut: new roads to therapeutics? *Trends Endocrinol. Metab.* *24*, 92–100.
- Janssen, S., Laermans, J., Iwakura, H., Tack, J., and Depoortere, I. (2012). Sensing of Fatty Acids for Octanoylation of Ghrelin Involves a Gustatory G-Protein. *PLoS ONE* *7*, e40168.

- Jensen, R.G. (1996). The lipids in human milk. *Prog. Lipid Res.* 35, 53–92.
- Jensen, R.G., DeJong, F.A., Clark, R.M., Palmgren, L.G., Liao, T.H., and Hamosh, M. (1982). Stereospecificity of premature human infant lingual lipase. *Lipids* 17, 570–572.
- Jensen, R.G., Ferris, A.M., Lammi-Keefe, C.J., and Henderson, R.A. (1990). Lipids of bovine and human milks: a comparison. *J Dairy Sci* 73, 223–240.
- Jensen, R.G., deJong, F.A., Lambert-Davis, L.G., and Hamosh, M. (1994). Fatty acid and positional selectivities of gastric lipase from premature human infants: in vitro studies. *Lipids* 29, 433–435.
- Jeppesen, P.B., and Mortensen, P.B. (1998). The influence of a preserved colon on the absorption of medium chain fat in patients with small bowel resection. *Gut* 43, 478–483.
- Johnson, R.C., Young, S.K., Cotter, R., Lin, L., and Rowe, W.B. (1990). Medium-chain-triglyceride lipid emulsion: metabolism and tissue distribution. *Am. J. Clin. Nutr.* 52, 502–508.
- Kabara, J.J., Swieczkowski, D.M., Conley, A.J., and Truant, J.P. (1972). Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2, 23–28.
- Kaiya, H., Van Der Geyten, S., Kojima, M., Hosoda, H., Kitajima, Y., Matsumoto, M., Geelissen, S., Darras, V.M., and Kangawa, K. (2002). Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology* 143, 3454–3463.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50, 2438–2443.
- Kanamoto, N., Akamizu, T., Tagami, T., Hataya, Y., Moriyama, K., Takaya, K., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., and Nakao, K. (2004). Genomic structure and characterization of the 5'-flanking region of the human ghrelin gene. *Endocrinology* 145, 4144–4153.
- Kang, K., Schmahl, J., Lee, J.-M., Garcia, K., Patil, K., Chen, A., Keene, M., Murphy, A., and Sleeman, M.W. (2012). Mouse ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) plays a critical role in bile acid reabsorption. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 26, 259–271.
- Karleskind, A. (1992). *Manuel des corps gras*.
- Kawai, T., and Fushiki, T. (2003). Importance of lipolysis in oral cavity for orosensory detection of fat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R447–R454.
- Kenealy, W.R., Cao, Y., and Weimer, P.J. (1995). Production of caproic acid by cocultures of ruminal cellulolytic bacteria and *Clostridium kluyveri* grown on cellulose and ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 507–513.
- Keys, A., Aravanis, C., Blackburn, H.W., Van Buchem, F.S., Buzina, R., Djordjevic, B.D., Dontas, A.S., Fidanza, F., Karvonen, M.J., Kimura, N., et al. (1966). Epidemiological studies related to coronary heart disease: characteristics of men aged 40–59 in seven countries. *Acta Med Scand Suppl* 460, 1–392.
- Keys, A., Menotti, A., Aravanis, C., Blackburn, H., Djordevic, B.S., Buzina, R., Dontas, A.S., Fidanza, F., Karvonen, M.J., Kimura, N., et al. (1984). The seven countries study: 2,289 deaths in 15 years. *Prev Med* 13, 141–154.
- Kirchner, H., Gutierrez, J.A., Solenberg, P.J., Pfluger, P.T., Czyzyk, T.A., Willency, J.A., Schurmann, A., Joost, H.G., Jandacek, R.J., Hale, J.E., et al. (2009). GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* 15, 741–745.
- Kleinz, M.J., Maguire, J.J., Skepper, J.N., and Davenport, A.P. (2006). Functional and immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of vascular tone in man. *Cardiovasc. Res.* 69, 227–235.

- Knockaert, L., Berson, A., Ribault, C., Prost, P.-E., Fautrel, A., Pajaud, J., Lepage, S., Lucas-Clerc, C., Bégué, J.-M., Fromenty, B., et al. (2011). Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. *Lab. Invest.* 92, 396–410.
- Kochan, G., Pilka, E.S., von Delft, F., Oppermann, U., and Yue, W.W. (2009). Structural Snapshots for the Conformation-dependent Catalysis by Human Medium-chain Acyl-coenzyme A Synthetase ACSM2A. *J. Mol. Biol.* 388, 997–1008.
- Kohno, D., Gao, H.-Z., Muroya, S., Kikuyama, S., and Yada, T. (2003). Ghrelin Directly Interacts With Neuropeptide-Y-Containing Neurons in the Rat Arcuate Nucleus Ca²⁺ Signaling via Protein Kinase A and N-Type Channel-Dependent Mechanisms and Cross-Talk With Leptin and Orexin. *Diabetes* 52, 948–956.
- Kojima, M., and Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev.* 85, 495–522.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660.
- Kojima, M., Hosoda, H., Kaiya, H., and Kangawa, K. (2004). Discovery of Ghrelin, an Endogenous Ligand for the Growth-Hormone Secret Agogue Receptor. In *Ghrelin*, (Springer), pp. 15–25.
- Konda, Y. (2002). Rat Gastric Mucosal Epithelial Cell Culture. In *Epithelial Cell Culture Protocols*, C. Wise, ed. (Humana Press), pp. 17–25.
- Krotkiewski, M. (2001). Value of VLCD supplementation with medium chain triglycerides. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 25, 1393–1400.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., et al. (1999). PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell* 4, 597–609.
- Kulkarni, B.V., and Mattes, R.D. (2014). Lingual lipase activity in the orosensory detection of fat by humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 306, R879–R885.
- Kumar, S., and Dodds, P.F. (1981). Fatty acid synthase from lactating bovine mammary gland. *Methods Enzymol.* 71 Pt C, 86–97.
- Kumar, R., Salehi, A., Rehfeld, J.F., Höglund, P., Lindström, E., and Håkanson, R. (2010). Proghrelin peptides: Desacyl ghrelin is a powerful inhibitor of acylated ghrelin, likely to impair physiological effects of acyl ghrelin but not of obestatin A study of pancreatic polypeptide secretion from mouse islets. *Regul. Pept.* 164, 65–70.
- Kuppens, R.J., Delhanty, P.J.D., Huisman, T.M., van der Lely, A.J., and Hokken-Koelega, A.C.S. (2016). Acylated and unacylated ghrelin during OGTT in Prader-Willi syndrome: Support for normal response to food intake. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*.
- Labarthe, F., Gélinas, R., and Des Rosiers, C. (2008). Medium-chain fatty acids as metabolic therapy in cardiac disease. *Cardiovasc. Drugs Ther. Spons. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* 22, 97–106.
- Lai, H.C., and Ney, D.M. (1998). Gastric digestion modifies absorption of butterfat into lymph chylomicrons in rats. *J. Nutr.* 128, 2403–2410.
- Langhans, W. (1996). Metabolic and glucostatic control of feeding. *Proc. Nutr. Soc.* 55, 497–515.
- Lavau, M.M., and Hashim, S.A. (1978). Effect of Medium Chain Triglyceride on Lipogenesis and Body Fat in the Rat. *J. Nutr.* 108, 613–620.
- Lee, H.-M., Wang, G., Englander, E.W., Kojima, M., and Greeley Jr, G.H. (2002). Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology* 143, 185–190.

- Legrand, P. (1991). Stearyl-CoA desaturase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1086, 89–94.
- Legrand, P., Beauchamp, E., Catheline, D., Pedrono, F., and Rioux, V. (2010). Short Chain Saturated Fatty Acids Decrease Circulating Cholesterol and Increase Tissue PUFA Content in the Rat. *Lipids* 45, 975–986.
- Legrand, P., Morise, A., and Kalonji, E. (2011). Update of French nutritional recommendations for fatty acids. *World Rev Nutr Diet* 102, 137–143.
- Leidy, H.J., Dougherty, K.A., Frye, B.R., Duke, K.M., and Williams, N.I. (2007). Twenty-four-hour Ghrelin Is Elevated after Calorie Restriction and Exercise Training in Non-obese Women. *Obesity* 15, 446–455.
- Van der Lely, A.J., Tschöp, M., Heiman, M.L., and Ghigo, E. (2004). Biological, Physiological, Pathophysiological, and Pharmacological Aspects of Ghrelin. *Endocr. Rev.* 25, 426–457.
- Lemarié, F., Beauchamp, E., Dayot, S., Duby, C., Legrand, P., and Rioux, V. (2015a). Dietary Caprylic Acid (C8:0) Does Not Increase Plasma Acylated Ghrelin but Decreases Plasma Unacylated Ghrelin in the Rat. *PLoS ONE* 10, e0133600.
- Lemarié, F., Beauchamp, E., Legrand, P., and Rioux, V. (2015b). Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation. *Biochimie*.
- Lengsfeld, H., Beaumier-Gallon, G., Chahinian, H., De Caro, A., Verger, R., Laugier, R., and Carrière, F. (2004). Physiology of Gastrointestinal Lipolysis and Therapeutical Use of Lipases and Digestive Lipase Inhibitors. In *Lipases and Phospholipases in Drug Development*, G. Müller, and S. Petry, eds. (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA), pp. 195–229.
- Li, Q., Zhong, W., Qiu, Y., Kang, X., Sun, X., Tan, X., Zhao, Y., Sun, X., Jia, W., and Zhou, Z. (2013). Preservation of hepatocyte nuclear factor 4 α contributes to the beneficial effect of dietary medium chain triglyceride on alcohol-induced hepatic lipid dyshomeostasis in rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 37, 587–598.
- Liao, T.H., Hamosh, P., and Hamosh, M. (1984). Fat digestion by lingual lipase: mechanism of lipolysis in the stomach and upper small intestine. *Pediatr. Res.* 18, 402–409.
- Liberato, M.V., Nascimento, A.S., Ayers, S.D., Lin, J.Z., Cvorov, A., Silveira, R.L., Martínez, L., Souza, P.C.T., Saidenberg, D., Deng, T., et al. (2012). Medium Chain Fatty Acids Are Selective Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) γ Activators and Pan-PPAR Partial Agonists. *PLoS ONE* 7, e36297.
- Libertini, L.J., and Smith, S. (1978). Purification and properties of a thioesterase from lactating rat mammary gland which modifies the product specificity of fatty acid synthetase. *J Biol Chem* 253, 1393–1401.
- Lim, C.T., Kola, B., Grossman, A., and Korbonits, M. (2011). The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. *Endocr. J.* 58, 707–710.
- Linder, M.E., and Deschenes, R.J. (2007). Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 74–84.
- Liu, K.-S. (1994). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 1179–1187.
- Lowe, M.E. (2002). The triglyceride lipases of the pancreas. *J. Lipid Res.* 43, 2007–2016.
- Lutter, M., Sakata, I., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Anderson, J.G., Jung, S., Birnbaum, S., Yanagisawa, M., Elmquist, J.K., Nestler, E.J., et al. (2008). The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat. Neurosci.* 11, 752–753.
- Maggio, C.A., and Koopmans, H.S. (1982). Food intake after intragastric meals of short-, medium, or long-chain triglyceride. *Physiol. Behav.* 28, 921–926.

- Malapaka, R.R.V., Khoo, S., Zhang, J., Choi, J.H., Zhou, X.E., Xu, Y., Gong, Y., Li, J., Yong, E.-L., Chalmers, M.J., et al. (2012). Identification and Mechanism of 10-Carbon Fatty Acid as Modulating Ligand of Peroxisome Proliferator-activated Receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 183–195.
- Mann, R.K., and Beachy, P.A. (2000). Cholesterol modification of proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1529, 188–202.
- Marchix, J., Choque, B., Kouba, M., Fautrel, A., Catheline, D., and Legrand, P. (2015). Excessive dietary linoleic acid induces proinflammatory markers in rats. *J. Nutr. Biochem.* 26, 1434–1441.
- Marguet, F., Cudrey, C., Verger, R., and Buono, G. (1994). Digestive lipases: inactivation by phosphonates. *Biochim. Biophys. Acta* 1210, 157–166.
- Marten, B., Pfeuffer, M., and Schrezenmeir, J. (2006). Medium-chain triglycerides. *Int. Dairy J.* 16, 1374–1382.
- Martin, D.D., Beauchamp, E., and Berthiaume, L.G. (2011). Post-translational myristoylation: Fat matters in cellular life and death. *Biochimie* 93, 18–31.
- Mattson, F.H., and Volpenhein, R.A. (1968). Hydrolysis of primary and secondary esters of glycerol by pancreatic juice. *J. Lipid Res.* 9, 79–84.
- Matzinger, D., Degen, L., Drewe, J., Meuli, J., Duebendorfer, R., Ruckstuhl, N., D'Amato, M., Rovati, L., and Beglinger, C. (2000). The role of long chain fatty acids in regulating food intake and cholecystokinin release in humans. *Gut* 46, 689–694.
- McCandless, D.W. (1985). Octanoic acid-induced coma and reticular formation energy metabolism. *Brain Res.* 335, 131–137.
- McGandy, R.B., Hegsted, D.M., and Myers, M.L. (1970). Use of semisynthetic fats in determining effects of specific dietary fatty acids on serum lipids in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 23, 1288–1298.
- McGrattan, C.J., Sullivan, J.D., and Ikawa, M. (1976). Inhibition of *Chlorella* (chlorophyceae) Growth by Fatty Acids, Using the Paper Disc Method^{1,2}. *J. Phycol.* 12, 129–131.
- McNeely, W., and Benfield, P. (1998). Orlistat. *Drugs* 56, 241–249; discussion 250.
- McTaggart, S.J. (2005). Isoprenylated proteins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 255–267.
- Mensink, R.P., and Katan, M.B. (1992). Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Arter. Thromb* 12, 911–919.
- Mensink, R.P., Zock, P.L., Kester, A.D., and Katan, M.B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am J Clin Nutr* 77, 1146–1155.
- Metges, C.C., and Wolfram, G. (1991). Medium- and long-chain triglycerides labeled with ¹³C: a comparison of oxidation after oral or parenteral administration in humans. *J. Nutr.* 121, 31–36.
- Miles, J.M., Cattalini, M., Sharbrough, F.W., Wold, L.E., Wharen, R.E., Gerich, J.E., and Haymond, M.W. (1991). Metabolic and Neurologic Effects of an Intravenous Medium-Chain Triglyceride Emulsion. *J. Parenter. Enter. Nutr.* 15, 37–41.
- Mitchell, D.A., Vasudevan, A., Linder, M.E., and Deschenes, R.J. (2006). Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J Lipid Res* 47, 1118–1127.
- Moechars, D., Depoortere, I., Moreaux, B., de Smet, B., Goris, I., Hoskens, L., Daneels, G., Kass, S., Ver Donck, L., Peeters, T., et al. (2006). Altered Gastrointestinal and Metabolic Function in the GPR39-Obestatin Receptor-Knockout Mouse. *Gastroenterology* 131, 1131–1141.

- Moreau, H., Gargouri, Y., Lecat, D., Junien, J.L., and Verger, R. (1988a). Screening of preduodenal lipases in several mammals. *Biochim. Biophys. Acta* 959, 247–252.
- Moreau, H., Laugier, R., Gargouri, Y., Ferrato, F., and Verger, R. (1988b). Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology* 95, 1221–1226.
- Mu, H., and Høy, C.-E. (2004). The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.* 43, 105–133.
- Mumme, K., and Stonehouse, W. (2015). Effects of Medium-Chain Triglycerides on Weight Loss and Body Composition: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J. Acad. Nutr. Diet.* 115, 249–263.
- Nadolski, M.J., and Linder, M.E. (2007). Protein lipidation. *FEBS J.* 274, 5202–5210.
- Nagao, K., and Yanagita, T. (2010). Medium-chain fatty acids: functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacol. Res. Off. J. Ital. Pharmacol. Soc.* 61, 208–212.
- Nagaya, N., Kojima, M., Uematsu, M., Yamagishi, M., Hosoda, H., Oya, H., Hayashi, Y., and Kangawa, K. (2001). Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1483–R1487.
- Nicolosi, R.J. (1997). Dietary fat saturation effects on low-density-lipoprotein concentrations and metabolism in various animal models. *Am J Clin Nutr* 65, 1617S – 1627S.
- Nishi, Y., Hiejima, H., Hosoda, H., Kaiya, H., Mori, K., Fukue, Y., Yanase, T., Nawata, H., Kangawa, K., and Kojima, M. (2005a). Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology* 146, 2255–2264.
- Nishi, Y., Hiejima, H., Mifune, H., Sato, T., Kangawa, K., and Kojima, M. (2005b). Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. *Endocrinology* 146, 2709–2715.
- Nishi, Y., Mifune, H., and Kojima, M. (2012). Ghrelin acylation by ingestion of medium-chain fatty acids. *Methods Enzymol.* 514, 303–315.
- Nishi, Y., Mifune, H., Yabuki, A., Tajiri, Y., Hirata, R., Tanaka, E., Hosoda, H., Kangawa, K., and Kojima, M. (2013). Changes in Subcellular Distribution of n-Octanoyl or n-Decanoyl Ghrelin in Ghrelin-Producing Cells. *Front. Endocrinol.* 4, 84.
- Noguchi, O., Takeuchi, H., Kubota, F., Tsuji, H., and Aoyama, T. (2002). Larger diet-induced thermogenesis and less body fat accumulation in rats fed medium-chain triacylglycerols than in those fed long-chain triacylglycerols. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 48, 524–529.
- Nosaka, N., Kasai, M., Nakamura, M., Takahashi, I., Itakura, M., Takeuchi, H., Aoyama, T., Tsuji, H., Okazaki, M., and KONDO, K. (2002). Effects of Dietary Medium-Chain Triacylglycerols on Serum Lipoproteins and Biochemical Parameters in Healthy Men. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1713–1718.
- Nosaka, N., Maki, H., Suzuki, Y., Haruna, H., Ohara, A., Kasai, M., Tsuji, H., Aoyama, T., Okazaki, M., Igarashi, O., et al. (2003). Effects of margarine containing medium-chain triacylglycerols on body fat reduction in humans. *J. Atheroscler. Thromb.* 10, 290–298.
- Nosjean, O., Briolay, A., and Roux, B. (1997). Mammalian GPI proteins: sorting, membrane residence and functions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* 1331, 153–186.
- Ogden, C., Carroll, Kit, B., and Flegal (2014). PRevalence of childhood and adult obesity in the united states, 2011-2012. *JAMA* 311, 806–814.
- Ohgusu, H., Shirouzu, K., Nakamura, Y., Nakashima, Y., Ida, T., Sato, T., and Kojima, M. (2009). Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 153–158.

- Ohgusu, H., Takahashi, T., and Kojima, M. (2012). Enzymatic characterization of GOAT, ghrelin O-acyltransferase. *Methods Enzymol.* *514*, 147–163.
- Ohlsson, L., Rosenquist, A., Rehfeld, J.F., and Härröd, M. (2014). Postprandial effects on plasma lipids and satiety hormones from intake of liposomes made from fractionated oat oil: two randomized crossover studies. *Food Nutr. Res.* *58*.
- Olds, T., Maher, C., Zumin, S., Péneau, S., Lioret, S., Castetbon, K., Bellisle, null, de Wilde, J., Hohepa, M., Maddison, R., et al. (2011). Evidence that the prevalence of childhood overweight is plateauing: data from nine countries. *Int. J. Pediatr. Obes. IJPO Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* *6*, 342–360.
- Olfat, F.O., Näslund, E., Freedman, J., Borén, T., and Engstrand, L. (2002). Cultured Human Gastric Explants: A Model for Studies of Bacteria-Host Interaction during Conditions of Experimental *Helicobacter pylori* Infection. *J. Infect. Dis.* *186*, 423–427.
- Olthof, E.D., Gulich, A.F., Renne, M.F., Landman, S., Joosten, L.A.B., Roelofs, H.M.J., and Wanten, G.J.A. (2015). Immune activation by medium-chain triglyceride-containing lipid emulsions is not modulated by n-3 lipids or toll-like receptor 4. *Toxicol. In Vitro* *29*, 1851–1858.
- Ooyama, K., Kojima, K., Aoyama, T., and Takeuchi, H. (2009). Decrease of food intake in rats after ingestion of medium-chain triacylglycerol. *J Nutr Sci Vitaminol Tokyo* *55*, 423–427.
- Ozawa, A., Cai, Y., and Lindberg, I. (2007). Production of Bioactive Peptides in an In Vitro System. *Anal. Biochem.* *366*, 182–189.
- Page, K.A., Williamson, A., Yu, N., McNay, E.C., Dzuira, J., McCrimmon, R.J., and Sherwin, R.S. (2009). Medium-Chain Fatty Acids Improve Cognitive Function in Intensively Treated Type 1 Diabetic Patients and Support In Vitro Synaptic Transmission During Acute Hypoglycemia. *Diabetes* *58*, 1237–1244.
- Papamandjaris, A.A., MacDougall, D.E., and Jones, P.J. (1998). Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci* *62*, 1203–1215.
- Park, S., Jiang, H., Zhang, H., and Smith, R.G. (2012). Modification of ghrelin receptor signaling by somatostatin receptor-5 regulates insulin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 19003–19008.
- Patterson, M., Murphy, K.G., le Roux, C.W., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *90*, 2205–2211.
- Pégorier, J.P., Duée, P.H., Herbin, C., Laulan, P.Y., Bladé, C., Peret, J., and Girard, J. (1988). Fatty acid metabolism in hepatocytes isolated from rats adapted to high-fat diets containing long- or medium-chain triacylglycerols. *Biochem. J.* *249*, 801–806.
- Pégorier, J.P., Duée, P.H., Clouet, P., Kohl, C., Herbin, C., and Girard, J. (1989). Octanoate metabolism in isolated hepatocytes and mitochondria from fetal, newborn and adult rabbit. Evidence for a high capacity for octanoate esterification in term fetal liver. *Eur. J. Biochem. FEBS* *184*, 681–686.
- Peino, R., Baldelli, R., Rodriguez-Garcia, J., Rodriguez-Segade, S., Kojima, M., Kangawa, K., Arvat, E., Ghigo, E., Dieguez, C., and Casanueva, F.F. (2000). Ghrelin-induced growth hormone secretion in humans. *Eur. J. Endocrinol.* *143*, R11–R14.
- Perello, M., and Dickson, S.L. (2015). Ghrelin Signalling on Food Reward: A Salient Link Between the Gut and the Mesolimbic System. *J. Neuroendocrinol.* *27*, 424–434.
- Perez-Tilve, D., Heppner, K., Kirchner, H., Lockie, S.H., Woods, S.C., Smiley, D.L., Tschöp, M., and Pfluger, P. (2011). Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects. *FASEB J.* *25*, 2814–2822.
- Perret, J.P. (1980). [Gastric lipolysis of maternal milk triglycerides, and gastric absorption of medium chain fatty acids in the young rabbit (author's transl)]. *J. Physiol. (Paris)* *76*, 159–166.

- Perret, J.P. (1982). [Gastric lipolysis in the young rabbit: origin and physiological importance of the lipase]. *J. Physiol. (Paris)* 78, 221–230.
- Plat, J., and Mensink, R.P. (2005). Food components and immune function. *Curr. Opin. Lipidol.* 16, 31–37.
- Point, V., Pavan Kumar, K.V.P., Marc, S., Delorme, V., Parsiegla, G., Amara, S., Carrière, F., Buono, G., Fotiadu, F., Canaan, S., et al. (2012a). Analysis of the discriminative inhibition of mammalian digestive lipases by 3-phenyl substituted 1,3,4-oxadiazol-2(3H)-ones. *Eur. J. Med. Chem.* 58, 452–463.
- Point, V., Malla, R.K., Diomande, S., Martin, B.P., Delorme, V., Carriere, F., Canaan, S., Rath, N.P., Spilling, C.D., and Cavalier, J. (2012b). Synthesis and Kinetic Evaluation of Cyclophostin and Cyclipostins Phosphonate Analogs As Selective and Potent Inhibitors of Microbial Lipases. *J. Med. Chem.* 55, 10204–10219.
- Porsgaard, T., Straarup, E.M., Mu, H., and Høy, C.-E. (2003). Effect of orlistat on fat absorption in rats: a comparison of normal rats and rats with diverted bile and pancreatic juice. *Lipids* 38, 1039–1043.
- Priego, T., Sanchez, J., Garcia, A.P., Palou, A., and Pico, C. (2013). Maternal dietary fat affects milk fatty acid profile and impacts on weight gain and thermogenic capacity of suckling rats. *Lipids* 48, 481–495.
- Purtell, L., Sze, L., Loughnan, G., Smith, E., Herzog, H., Sainsbury, A., Steinbeck, K., Campbell, L.V., and Viardot, A. (2011). In adults with Prader-Willi syndrome, elevated ghrelin levels are more consistent with hyperphagia than high PYY and GLP-1 levels. *Neuropeptides* 45, 301–307.
- Qader, S.S., Håkanson, R., Rehfeld, J.F., Lundquist, I., and Salehi, A. (2008). Proghrelin-derived peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul. Pept.* 146, 230–237.
- Ransac, S., Gargouri, Y., Marguet, F., Buono, G., Beglinger, C., Hildebrand, P., Lengsfeld, H., Hadváry, P., and Verger, R. (1997). Covalent inactivation of lipases. *Methods Enzymol.* 286, 190–231.
- Rau, T.T., Sonst, A., Rogler, A., Burnat, G., Neumann, H., Oeckl, K., Neuhuber, W., Dimmler, A., Faller, G., Brzozowski, T., et al. (2013). Gastrin mediated down regulation of ghrelin and its pathophysiological role in atrophic gastritis. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 64, 719–725.
- Reed, J.A., Benoit, S.C., Pfluger, P.T., Tschöp, M.H., D'Alessio, D.A., and Seeley, R.J. (2008). Mice with chronically increased circulating ghrelin develop age-related glucose intolerance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E752–E760.
- Reimer, M.K., Pacini, G., and Ahrén, B. (2003). Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 144, 916–921.
- Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1451, 1–16.
- Reubsæet, F.A., Veerkamp, J.H., Bukkens, S.G., Trijbels, J.M., and Monnens, L.A. (1988). Acyl-CoA oxidase activity and peroxisomal fatty acid oxidation in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 958, 434–442.
- Rioux, V., and Legrand, P. (2007). Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10, 752–758.
- Rioux, V., Catheline, D., Bouriel, M., and Legrand, P. (1999). High performance liquid chromatography of fatty acids as naphthacyl derivatives. *Analisis* 27, 186–193.
- Rioux, V., Lemarchal, P., and Legrand, P. (2000). Myristic acid, unlike palmitic acid, is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes. *J Nutr Biochem* 11, 198–207.
- Rioux, V., Catheline, D., Bouriel, M., and Legrand, P. (2005). Dietary myristic acid at physiologically relevant levels increases the tissue content of C20:5 n-3 and C20:3 n-6 in the rat. *Reprod Nutr Dev* 45, 599–612.

- Rioux, V., Beauchamp, E., Pedrono, F., Daval, S., Molle, D., Catheline, D., and Legrand, P. (2006). Identification and characterization of recombinant and native rat myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferases. *Mol Cell Biochem* 286, 161–170.
- Rioux, V., Catheline, D., and Legrand, P. (2007). In rat hepatocytes, myristic acid occurs through lipogenesis, palmitic shortening and lauric acid elongation. *Animal* 1, 820–826.
- Rioux, V., Pedrono, F., Blanchard, H., Duby, C., Boulier-Monthean, N., Bernard, L., Beauchamp, E., Catheline, D., and Legrand, P. (2013). Trans-vaccenate is Delta13-desaturated by FADS3 in rodents. *J Lipid Res* 54, 3438–3452.
- Roberts, I.M. (1988). Stability of lingual lipase in vivo: studies of the iodinated enzyme in the rat stomach and duodenum. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 960, 107–110.
- Roberts, I.M., Montgomery, R.K., and Carey, M.C. (1984). Rat lingual lipase: partial purification, hydrolytic properties, and comparison with pancreatic lipase. *Am. J. Physiol.* 247, G385–G393.
- Rodríguez, A., Gómez-Ambrosi, J., Catalán, V., Gil, M.J., Becerril, S., Sáinz, N., Silva, C., Salvador, J., Colina, I., and Frühbeck, G. (2009). Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int. J. Obes.* 33, 541–552.
- Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., and Verger, R. (1993). Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality* 5, 24–30.
- Rolls, B.J., Gnizak, N., Summerfelt, A., and Laster, L.J. (1988). Food intake in dieters and nondieters after a liquid meal containing medium-chain triglycerides. *Am. J. Clin. Nutr.* 48, 66–71.
- Roman, C., Carriere, F., Villeneuve, P., Pina, M., Millet, V., Simeoni, U., and Sarles, J. (2007). Quantitative and qualitative study of gastric lipolysis in premature infants: do MCT-enriched infant formulas improve fat digestion? *Pediatr. Res.* 61, 83–88.
- Roy, C.C., Kien, C.L., Bouthillier, L., and Levy, E. (2006). Short-Chain Fatty Acids: Ready for Prime Time? *Nutr. Clin. Pract.* 21, 351–366.
- Royce, L.A., Liu, P., Stebbins, M.J., Hanson, B.C., and Jarboe, L.R. (2013). The damaging effects of short chain fatty acids on *Escherichia coli* membranes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 8317–8327.
- Rucinski, M., Ziolkowska, A., Szyszka, M., Hochol, A., and Malendowicz, L.K. (2012). Evidence suggesting that ghrelin O-acyl transferase inhibitor acts at the hypothalamus to inhibit hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis function in the rat. *Peptides* 35, 149–159.
- Sakata, I., Nakamura, K., Yamazaki, M., Matsubara, M., Hayashi, Y., Kangawa, K., and Sakai, T. (2002). Ghrelin-producing cells exist as two types of cells, closed- and opened-type cells, in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 23, 531–536.
- Sakata, I., Yang, J., Lee, C.E., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Elmquist, J.K., and Zigman, J.M. (2009). Colocalization of ghrelin O-acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 297, E134–E141.
- Sakata, I., Sakai, T., Sakata, I., and Sakai, T. (2010). Ghrelin Cells in the Gastrointestinal Tract, Ghrelin Cells in the Gastrointestinal Tract. *Int. J. Pept. Int. J. Pept.* 2010, 2010, e945056.
- Samra, R.A. (2010). Fats and Satiety. In *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects*, J.-P. Montmayeur, and J. le Coutre, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis),.
- Sams, L., Paume, J., Giallo, J., and Carrière, F. (2016). Relevant pH and lipase for in vitro models of gastric digestion. *Food Funct.* 7, 30–45.

- Sangiao-Alvarellos, S., Vázquez, M.J., Varela, L., Nogueiras, R., Saha, A.K., Cordido, F., López, M., and Diéguez, C. (2009). Central ghrelin regulates peripheral lipid metabolism in a growth hormone-independent fashion. *Endocrinology* *150*, 4562–4574.
- Sarda, L., and Desnuelle, P. (1958). [Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions]. *Biochim. Biophys. Acta* *30*, 513–521.
- Sarda, P., Lepage, G., Roy, C.C., and Chessex, P. (1987). Storage of medium-chain triglycerides in adipose tissue of orally fed infants. *Am J Clin Nutr* *45*, 399–405.
- Sato, K., Cho, Y., Tachibana, S., Chiba, T., Schneider, W.J., and Akiba, Y. (2005). Impairment of VLDL secretion by medium-chain fatty acids in chicken primary hepatocytes is affected by the chain length. *J. Nutr.* *135*, 1636–1641.
- Sato, T., Nakamura, Y., Shiimura, Y., Ohgusu, H., Kangawa, K., and Kojima, M. (2012). Structure, regulation and function of ghrelin. *J. Biochem. (Tokyo)* *151*, 119–128.
- Scheig, R., and Klatskin, G. (1968). Hepatic metabolism of 1-¹⁴C octanoic and 1-¹⁴C palmitic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* *45*, 31–33.
- Schlaermann, P., Toelle, B., Berger, H., Schmidt, S.C., Glanemann, M., Ordemann, J., Bartfeld, S., Mollenkopf, H.J., and Meyer, T.F. (2014). A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gut* *gutjnl* – 2014–307949.
- Seglen, P.O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Meth Cell Biol* *13*, 29–83.
- Seim, I., Collet, C., Herington, A.C., and Chopin, L.K. (2007). Revised genomic structure of the human ghrelin gene and identification of novel exons, alternative splice variants and natural antisense transcripts. *BMC Genomics* *8*, 298.
- Seki, G. (2013). Unexpected effect of the appetite-stimulating hormone ghrelin on ENaC: hunger for sodium? *Kidney Int.* *84*, 438–440.
- Sendama, W., and Shipley, M. (2015). Traumatic chylothorax: A case report and review. *Respir. Med. Case Rep.* *14*, 47–48.
- Shimbara, T., Mondal, M.S., Kawagoe, T., Toshinai, K., Koda, S., Yamaguchi, H., Date, Y., and Nakazato, M. (2004). Central administration of ghrelin preferentially enhances fat ingestion. *Neurosci. Lett.* *369*, 75–79.
- Shinohara, H., Ogawa, A., Kasai, M., and Aoyama, T. (2005). Effect of randomly interesterified triacylglycerols containing medium- and long-chain fatty acids on energy expenditure and hepatic fatty acid metabolism in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *69*, 1811–1818.
- Shinohara, H., Wu, J., Kasai, M., and Aoyama, T. (2006). Randomly Interesterified Triacylglycerol Containing Medium- and Long-Chain Fatty Acids Stimulates Fatty Acid Metabolism in White Adipose Tissue of Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *70*, 2919–2926.
- Singh, N., Wakil, S.J., and Stoops, J.K. (1984). On the question of half- or full-site reactivity of animal fatty acid synthetase. *J Biol Chem* *259*, 3605–3611.
- Siri-Tarino, P.W., Sun, Q., Hu, F.B., and Krauss, R.M. (2010). Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* *91*, 502–509.
- Smet, B.D., Depoortere, I., Moechars, D., Swennen, Q., Moreaux, B., Cryns, K., Tack, J., Buyse, J., Coulie, B., and Peeters, T.L. (2006). Energy Homeostasis and Gastric Emptying in Ghrelin Knockout Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *316*, 431–439.
- Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H., Howard, A.D., Feighner, S.D., Cheng, K., Hickey, G.J., Wyvratt, M.J., Fisher, M.H., Nargund, R.P., and Patchett, A.A. (1997). Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr. Rev.* *18*, 621–645.

- Solomon, T.P.J., Chambers, E.S., Jeukendrup, A.E., Toogood, A.A., and Blannin, A.K. (2008). The effect of feeding frequency on insulin and ghrelin responses in human subjects. *Br. J. Nutr.* *100*, 810–819.
- Song, Y., You, N.-C.Y., Song, Y., Kang, M.K., Hou, L., Wallace, R., Eaton, C.B., Tinker, L.F., and Liu, S. (2013). Intake of Small-to-Medium-Chain Saturated Fatty Acids Is Associated with Peripheral Leukocyte Telomere Length in Postmenopausal Women. *J. Nutr.* *143*, 1754–1762.
- Soriano-Guillén, L., Barrios, V., Campos-Barros, A., and Argente, J. (2004). Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J. Pediatr.* *144*, 36–42.
- Souza-Moreira, L., Delgado-Maroto, V., Morell, M., O'Valle, F., Del Moral, R.G., and Gonzalez-Rey, E. (2013). Therapeutic effect of ghrelin in experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting antigen-specific Th1/Th17 responses and inducing regulatory T cells. *Brain. Behav. Immun.* *30*, 54–60.
- Staggers, J.E., Fernando-Warnakulasuriya, G.J., and Wells, M.A. (1981). Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. II. Triacylglycerols: molecular species, stereospecific analysis, and specificity of hydrolysis by lingual lipase. *J. Lipid Res.* *22*, 675–679.
- Stengel, A., Goebel, M., Wang, L., Taché, Y., Sachs, G., and Lambrecht, N.W.G. (2010). Differential distribution of ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) immunoreactive cells in the mouse and rat gastric oxyntic mucosa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *392*, 67–71.
- Stevanovic, D., Trajkovic, V., Müller-Lühlhoff, S., Brandt, E., Abplanalp, W., Bumke-Vogt, C., Liehl, B., Wiedmer, P., Janjetovic, K., Starcevic, V., et al. (2013). Ghrelin-induced food intake and adiposity depend on central mTORC1/S6K1 signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* *381*, 280–290.
- St-Onge, M.P., and Jones, P.J. (2002). Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *J. Nutr.* *132*, 329–332.
- St-Onge, M.-P., and Jones, P.J.H. (2003). Greater rise in fat oxidation with medium-chain triglyceride consumption relative to long-chain triglyceride is associated with lower initial body weight and greater loss of subcutaneous adipose tissue. *Int. J. Obes.* *27*, 1565–1571.
- St-Onge, M.P., Bourque, C., Jones, P.J.H., Ross, R., and Parsons, W.E. (2003a). Medium-versus long-chain triglycerides for 27 days increases fat oxidation and energy expenditure without resulting in changes in body composition in overweight women. *Int. J. Obes.* *27*, 95–102.
- St-Onge, M.-P., Ross, R., Parsons, W.D., and Jones, P.J.H. (2003b). Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men. *Obes. Res.* *11*, 395–402.
- St-Onge, M.P., Bosarge, A., Goree, L.L., and Darnell, B. (2008). Medium chain triglyceride oil consumption as part of a weight loss diet does not lead to an adverse metabolic profile when compared to olive oil. *J. Am. Coll. Nutr.* *17*, 547–552.
- Stubbs, R.J., and Harbron, C.G. (1996). Covert manipulation of the ratio of medium- to long-chain triglycerides in isoenergetically dense diets: effect on food intake in ad libitum feeding men. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* *20*, 435–444.
- Sun, Y., Ahmed, S., and Smith, R.G. (2003). Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 7973–7981.
- Sun, Y., Wang, P., Zheng, H., and Smith, R.G. (2004). Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4679–4684.
- Sun, Y., Asnicar, M., Saha, P.K., Chan, L., and Smith, R.G. (2006). Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab.* *3*, 379–386.

- Suzuki, M., Takaishi, S., Nagasaki, M., Onozawa, Y., Iino, I., Maeda, H., Komai, T., and Oda, T. (2013). Medium-chain fatty acid-sensing receptor, GPR84, is a proinflammatory receptor. *J. Biol. Chem.* 288, 10684–10691.
- Swift, L.L., Hill, J.O., Peters, J.C., and Greene, H.L. (1990). Medium-chain fatty acids: evidence for incorporation into chylomicron triglycerides in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 52, 834–836.
- Swift, L.L., Hill, J.O., Peters, J.C., and Greene, H.L. (1992). Plasma lipids and lipoproteins during 6 d of maintenance feeding with long-chain, medium-chain, and mixed-chain triglycerides. *Am. J. Clin. Nutr.* 56, 881–886.
- Tachibana, S., Sato, K., Cho, Y., Chiba, T., Schneider, W.J., and Akiba, Y. (2005). Octanoate reduces very low-density lipoprotein secretion by decreasing the synthesis of apolipoprotein B in primary cultures of chicken hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1737, 36–43.
- Takagi, K., Legrand, R., Asakawa, A., Amitani, H., François, M., Tennoune, N., Coëffier, M., Claeysens, S., do Rego, J.-C., Déchelotte, P., et al. (2013). Anti-ghrelin immunoglobulins modulate ghrelin stability and its orexigenic effect in obese mice and humans. *Nat. Commun.* 4.
- Takahashi, T., Ida, T., Sato, T., Nakashima, Y., Nakamura, Y., Tsuji, A., and Kojima, M. (2009). Production of n-octanoyl-modified ghrelin in cultured cells requires prohormone processing protease and ghrelin O-acyltransferase, as well as n-octanoic acid. *J. Biochem. (Tokyo)* 146, 675–682.
- Takase, S., Morimoto, A., Nakanishi, M., and Muto, Y. (1977). Long-Term Effect of Medium-Chain Triglyceride on Hepatic Enzymes Catalyzing Lipogenesis and Cholesterologenesis in Rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* 23, 43–51.
- Takeuchi, H., Noguchi, O., Sekine, S., Kobayashi, A., and Aoyama, T. (2006). Lower weight gain and higher expression and blood levels of adiponectin in rats fed medium-chain TAG compared with long-chain TAG. *Lipids* 41, 207–212.
- Takeuchi, H., Sekine, S., Kojima, K., and Aoyama, T. (2008). The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17 *Suppl 1*, 320–323.
- Tam, B.T., Pei, X.M., Yung, B.Y., Yip, S.P., Chan, L.W., Wong, C.S., and Siu, P.M. (2015). Unacylated ghrelin restores insulin and autophagic signaling in skeletal muscle of diabetic mice. *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.* 467, 2555–2569.
- Tanaka, S., Saitoh, O., Tabata, K., Matsuse, R., Kojima, K., Sugi, K., Nakagawa, K., Kayazawa, M., Teranishi, T., Uchida, K., et al. (2001). Medium-chain fatty acids stimulate interleukin-8 production in Caco-2 cells with different mechanisms from long-chain fatty acids¹. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16, 748–754.
- Taub, D.D. (2007). Novel Connections Between the Neuroendocrine and Immune Systems: The Ghrelin Immunoregulatory Network. B.-V. & Hormones, ed. (Academic Press), pp. 325–346.
- Taylor, M.S., Hwang, Y., Hsiao, P.-Y., Boeke, J.D., and Cole, P.A. (2012). Ghrelin O-Acyltransferase Assays and Inhibition. *Methods Enzymol.* 514, 205–228.
- Taylor, M.S., Ruch, T.R., Hsiao, P.-Y., Hwang, Y., Zhang, P., Dai, L., Huang, C.R.L., Berndsen, C.E., Kim, M.-S., Pandey, A., et al. (2013). Architectural Organization of the Metabolic Regulatory Enzyme Ghrelin O-Acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 288, 32211–32228.
- Terano, A., Ivey, K.J., Stachura, J., Sekhon, S., Hosojima, H., McKenzie, W.N., Krause, W.J., and Wyche, J.H. (1982). Cell culture of rat gastric fundic mucosa. *Gastroenterology* 83, 1280–1291.
- Teuffel, P., Wang, L., Prinz, P., Goebel-Stengel, M., Scharner, S., Kobelt, P., Hofmann, T., Rose, M., Klapp, B.F., Reeve, J.R., et al. (2015). Treatment with the ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) inhibitor GO-CoA-Tat reduces food intake by reducing meal frequency in rats. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 66, 493–503.

- Theander-Carrillo, C., Wiedmer, P., Cettour-Rose, P., Nogueiras, R., Perez-Tilve, D., Pfluger, P., Castaneda, T.R., Muzzin, P., Schürmann, A., Szanto, I., et al. (2006). Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J. Clin. Invest.* *116*, 1983–1993.
- Tholstrup, T. (2006). Dairy products and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* *17*, 1–10.
- Tholstrup, T., Vessby, B., and Sandstrom, B. (2003). Difference in effect of myristic and stearic acid on plasma HDL cholesterol within 24 h in young men. *Eur J Clin Nutr* *57*, 735–742.
- Tholstrup, T., Ehnholm, C., Jauhiainen, M., Petersen, M., Høy, C.-E., Lund, P., and Sandström, B. (2004). Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. *Am. J. Clin. Nutr.* *79*, 564–569.
- Thompson, N.M., Gill, D.A.S., Davies, R., Loveridge, N., Houston, P.A., Robinson, I.C.A.F., and Wells, T. (2004). Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* *145*, 234–242.
- Thormar, H., Isaacs, C.E., Brown, H.R., Barshatzky, M.R., and Pessolano, T. (1987). Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* *31*, 27–31.
- Timmermans, M.Y., Reekmans, G., Teuchy, H.J., and Kupers, L.P. (1996). Inhibition studies on calf pregastric esterase: the enzyme has no functional thiol group. *Biochem. J.* *314*, 931–936.
- Tolle, V., Bassant, M.-H., Zizzari, P., Poindessous-Jazat, F., Tomasetto, C., Epelbaum, J., and Bluet-Pajot, M.-T. (2002). Ultradian Rhythmicity of Ghrelin Secretion in Relation with GH, Feeding Behavior, and Sleep-Wake Patterns in Rats. *Endocrinology* *143*, 1353–1361.
- Tomasetto, C., Wendling, C., Rio, M.C., and Poitras, P. (2001). Identification of cDNA encoding motilin related peptide/ghrelin precursor from dog fundus. *Peptides* *22*, 2055–2059.
- Tømmerås, K., Chen, Y., Rhedin, M., Cabero, J.L., and Mårdh, S. (1997). Proliferation and differentiation of cells from explants of fetal rat stomach. *Acta Physiol. Scand.* *159*, 155–161.
- Tong, J., Davis, H.W., Summer, S., Benoit, S.C., Haque, A., Bidlingmaier, M., Tschöp, M.H., and D'Alessio, D. (2014). Acute administration of unacylated ghrelin has no effect on Basal or stimulated insulin secretion in healthy humans. *Diabetes* *63*, 2309–2319.
- Toshinai, K., Yamaguchi, H., Sun, Y., Smith, R.G., Yamanaka, A., Sakurai, T., Date, Y., Mondal, M.S., Shimbara, T., Kawagoe, T., et al. (2006). Des-Acyl Ghrelin Induces Food Intake by a Mechanism Independent of the Growth Hormone Secretagogue Receptor. *Endocrinology* *147*, 2306–2314.
- Traul, K.A., Driedger, A., Ingle, D.L., and Nakhasi, D. (2000). Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food Chem. Toxicol.* *38*, 79–98.
- Tremblay, A.J., Lamarche, B., Labonté, M.-È., Lépine, M.-C., Lemelin, V., and Couture, P. (2014). Dietary medium-chain triglyceride supplementation has no effect on apolipoprotein B-48 and apolipoprotein B-100 kinetics in insulin-resistant men. *Am. J. Clin. Nutr.* *99*, 54–61.
- Tsai, Y.H., Park, S., Kovacic, J., and Snook, J.T. (1999). Mechanisms mediating lipoprotein responses to diets with medium-chain triglyceride and lauric acid. *Lipids* *34*, 895–905.
- Tschöp, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* *407*, 908–913.
- Tsubone, T., Masaki, T., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., and Yoshimatsu, H. (2005). Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regul. Pept.* *130*, 97–103.
- Tsuji, H., Kasai, M., Takeuchi, H., Nakamura, M., Okazaki, M., and Kondo, K. (2001). Dietary medium-chain triacylglycerols suppress accumulation of body fat in a double-blind, controlled trial in healthy men and women. *J Nutr* *131*, 2853–2859.

- Turkenkopf, I.J., Maggio, C.A., and Greenwood, M.R. (1982). Effect of high fat weanling diets containing either medium-chain triglycerides or long-chain triglycerides on the development of obesity in the Zucker rat. *J. Nutr.* *112*, 1254–1263.
- Uribe, M., Zamora-Valdés, D., Moreno-Portillo, M., Bermejo-Martínez, L., Pichardo-Bahena, R., Baptista-González, H.A., Ponciano-Rodríguez, G., Uribe, M.H., Medina-Santillán, R., and Méndez-Sánchez, N. (2008). Hepatic expression of ghrelin and adiponectin and their receptors in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann. Hepatol.* *7*, 67–71.
- Van Dijck, A., Annemie, V.D., Van Dam, D., Debby, V.D., Vergote, V., Valentijn, V., De Spiegeleer, B., Bart, D.S., Luyten, W., Walter, L., et al. (2009). Central administration of obestatin fails to show inhibitory effects on food and water intake in mice. *Regul. Pept.* *156*, 77–82.
- van Schalkwijk, D.B., Pasma, W.J., Hendriks, H.F.J., Verheij, E.R., Rubingh, C.M., van Bochove, K., Vaes, W.H.J., Adiels, M., Freidig, A.P., and de Graaf, A.A. (2014). Dietary medium chain fatty acid supplementation leads to reduced VLDL lipolysis and uptake rates in comparison to linoleic acid supplementation. *PLoS One* *9*, e100376.
- Van Wymelbeke, V., Himaya, A., Louis-Sylvestre, J., and Fantino, M. (1998). Influence of medium-chain and long-chain triacylglycerols on the control of food intake in men. *Am. J. Clin. Nutr.* *68*, 226–234.
- Van Wymelbeke, V., Louis-Sylvestre, J., and Fantino, M. (2001). Substrate oxidation and control of food intake in men after a fat-substitute meal compared with meals supplemented with an isoenergetic load of carbohydrate, long-chain triacylglycerols, or medium-chain triacylglycerols. *Am. J. Clin. Nutr.* *74*, 620–630.
- Volante, M., Allia, E., Gugliotta, P., Funaro, A., Broglio, F., Deghenghi, R., Muccioli, G., Ghigo, E., and Papotti, M. (2002). Expression of ghrelin and of the GH secretagogue receptor by pancreatic islet cells and related endocrine tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 1300–1308.
- Wakil, S.J., Stoops, J.K., and Joshi, V.C. (1983). Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem* *52*, 537–579.
- Walker, A.K., Ibia, I.E., and Zigman, J.M. (2012). Disruption of cue-potentiated feeding in mice with blocked ghrelin signaling. *Physiol. Behav.* *108*, 34–43.
- Wanders, R.J.A., Komen, J., and Kemp, S. (2011). Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *FEBS J.* *278*, 182–194.
- Wang, Q., Liu, C., Uchida, A., Chuang, J.-C., Walker, A., Liu, T., Osborne-Lawrence, S., Mason, B.L., Mosher, C., Berglund, E.D., et al. (2014). Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. *Mol. Metab.* *3*, 64–72.
- Wanten, G.J.A., Janssen, F.P., and Naber, A.H.J. (2002). Saturated triglycerides and fatty acids activate neutrophils depending on carbon chain-length. *Eur. J. Clin. Invest.* *32*, 285–289.
- Warzecha, Z., Ceranowicz, P., Dembinski, M., Cieszkowski, J., Ginter, G., Ptak-Belowska, A., and Dembinski, A. (2014). Involvement of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 activity in the therapeutic effect of ghrelin in the course of ethanol-induced gastric ulcers in rats. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* *65*, 95–106.
- Watkins, P.A. (1997). Fatty acid activation. *Prog. Lipid Res.* *36*, 55–83.
- Wei, W., Wang, G., Qi, X., Englander, E.W., and Greeley, G.H. (2005). Characterization and regulation of the rat and human ghrelin promoters. *Endocrinology* *146*, 1611–1625.
- Wein, S., Wolfram, S., Schrezenmeir, J., Gasperiková, D., Klimes, I., and Seböková, E. (2009). Medium-chain fatty acids ameliorate insulin resistance caused by high-fat diets in rats. *Diabetes Metab. Res. Rev.* *25*, 185–194.
- Westerterp, K.R. (2004). Diet induced thermogenesis. *Nutr. Metab.* *1*, 5.

- Wierup, N., Yang, S., McEvelly, R.J., Mulder, H., and Sundler, F. (2004). Ghrelin is expressed in a novel endocrine cell type in developing rat islets and inhibits insulin secretion from INS-1 (832/13) cells. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *52*, 301–310.
- Wierup, N., Sundler, F., and Heller, R.S. (2014). The islet ghrelin cell. *J. Mol. Endocrinol.* *52*, R35–R49.
- Winkler, F.K., D'Arcy, A., and Hunziker, W. (1990). Structure of human pancreatic lipase. *Nature* *343*, 771–774.
- Wortley, K.E., Anderson, K.D., Garcia, K., Murray, J.D., Malinova, L., Liu, R., Moncrieffe, M., Thabet, K., Cox, H.J., Yancopoulos, G.D., et al. (2004). Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8227–8232.
- Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., Murphy, K.G., Dakin, C.L., Taheri, S., Kennedy, A.R., Roberts, G.H., Morgan, D.G., Ghatei, M.A., et al. (2000). The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* *141*, 4325–4328.
- Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillon, W.S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2001). Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *86*, 5992.
- Xie, C., Woollett, L.A., Turley, S.D., and Dietschy, J.M. (2002). Fatty acids differentially regulate hepatic cholesteryl ester formation and incorporation into lipoproteins in the liver of the mouse. *J. Lipid Res.* *43*, 1508–1519.
- Xue, B., and Kahn, B.B. (2006). AMPK integrates nutrient and hormonal signals to regulate food intake and energy balance through effects in the hypothalamus and peripheral tissues. *J. Physiol.* *574*, 73–83.
- Yamauchi, T., Waki, H., Kamon, J., Murakami, K., Motojima, K., Komeda, K., Miki, H., Kubota, N., Terauchi, Y., Tsuchida, A., et al. (2001). Inhibition of RXR and PPAR γ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* *108*, 1001–1013.
- Yang, J., Brown, M.S., Liang, G., Grishin, N.V., and Goldstein, J.L. (2008a). Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* *132*, 387–396.
- Yang, J., Zhao, T.J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2008b). Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. *Proc Natl Acad Sci U A* *105*, 10750–10755.
- Yap, M.C., Kostiuk, M.A., Martin, D.D., Perinpanayagam, M.A., Hak, P.G., Siddam, A., Majjigapu, J.R., Rajaiah, G., Keller, B.O., Prescher, J.A., et al. (2010). Rapid and selective detection of fatty acylated proteins using omega-alkynyl-fatty acids and click chemistry. *J Lipid Res* *51*, 1566–1580.
- Yaqoob, P., Sherrington, E.J., Jeffery, N.M., Sanderson, P., Harvey, D.J., Newsholme, E.A., and Calder, P.C. (1995). Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *27*, 297–310.
- Yasuda, T., Masaki, T., Kakuma, T., and Yoshimatsu, H. (2003). Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *Neurosci. Lett.* *349*, 75–78.
- Yi, C.-X., Heppner, K.M., Kirchner, H., Tong, J., Bielohuby, M., Gaylinn, B.D., Müller, T.D., Bartley, E., Davis, H.W., Zhao, Y., et al. (2012). The GOAT-ghrelin system is not essential for hypoglycemia prevention during prolonged calorie restriction. *PLoS One* *7*, e32100.
- You, Y.Q., Ling, P.R., Qu, J.Z., and Bistrain, B.R. (2008). Effects of medium-chain triglycerides, long-chain triglycerides, or 2-monododecanoin on fatty acid composition in the portal vein, intestinal lymph, and systemic circulation in rats. *JPEN J Parenter Enter. Nutr* *32*, 169–175.
- Zammit, V.A. (1984). Mechanisms of regulation of the partition of fatty acids between oxidation and esterification in the liver. *Prog Lipid Res* *23*, 39–67.

- Zavizion, B., van Duffelen, M., Schaeffer, W., and Politis, I. (1996). Establishment and characterization of a bovine mammary epithelial cell line with unique properties. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* *32*, 138–148.
- Zhang, G., Yin, X., Qi, Y., Pendyala, L., Chen, J., Hou, D., and Tang, C. (2010). Ghrelin and Cardiovascular Diseases. *Curr. Cardiol. Rev.* *6*, 62–70.
- Zhang, J.V., Ren, P.-G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.-W., Rauch, R., Klein, C., and Hsueh, A.J.W. (2005). Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake. *Science* *310*, 996–999.
- Zhang, W., Yu, G., Huang, Y., Xu, D., Ren, J., Jiang, L., Wu, C., and Tong, D. (2013). Expression of ghrelin and GHSR-1a in mammary glands of dairy goat during the lactation and the effects of gherlin on regulation of mammary function in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* *370*, 20–31.
- Zhang, Y., Fang, F., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Zhao, T.-J. (2015). Reduced autophagy in livers of fasted, fat-depleted, ghrelin-deficient mice: reversal by growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 1226–1231.
- Zhao, T.-J., Liang, G., Li, R.L., Xie, X., Sleeman, M.W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2010). Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 7467–7472.
- Zhu, X., Cao, Y., Voogd, K., Voodg, K., and Steiner, D.F. (2006). On the processing of proghrelin to ghrelin. *J. Biol. Chem.* *281*, 38867–38870.
- Zizzari, P., Longchamps, R., Epelbaum, J., and Bluet-Pajot, M.T. (2007). Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* *148*, 1648–1653.

Annexe 1

Articles publiés

Lemarié, F., Beauchamp, E., Dayot, S., Duby, C., Legrand, P., and Rioux, V. (2015a). Dietary Caprylic Acid (C8:0) Does Not Increase Plasma Acylated Ghrelin but Decreases Plasma Unacylated Ghrelin in the Rat. *PloS One* 10, e0133600.

Lemarié, F., Beauchamp, E., Legrand, P., and Rioux, V. (2015b). Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation. *Biochimie*.

Articles prochainement soumis

Lemarié, F., Cavalier, J.-F., Garcia, C., Boissel, F., Point, V., Catheline, D., Legrand, P., Carrière, F., Rioux, V. (2016). Effect of preduodenal lipase inhibition in suckling rats on dietary octanoic acid (C8:0) gastric absorption and plasma octanoylated ghrelin concentration (*soumission au journal BBA Molecular and Cell Biology of Lipids*)

Communications orales

Lemarié, F., Beauchamp, E., Legrand, P., and Rioux, V. (2014) Dietary caprylic acid (C8:0) increases stomach C8:0 level and plasma octanoylated ghrelin but has no effect on food consumption and body weight gain in the rat. Eurofed-Gerli, Montpellier

Lemarié, F., Cavalier, J.-F., Carrière, F., Garcia, C., Boissel, F., Catheline, D., Legrand, P., and Rioux, V., (2015). Effect of preduodenal lipase and gastric absorption on ghrelin octanoylation in rats. Gerli, Strasbourg

RESEARCH ARTICLE

Dietary Caprylic Acid (C8:0) Does Not Increase Plasma Acylated Ghrelin but Decreases Plasma Unacylated Ghrelin in the Rat

Fanny Lemarié, Erwan Beauchamp, Stéphanie Dayot, Cécile Duby, Philippe Legrand, Vincent Rioux*

Laboratory of Biochemistry and Human Nutrition, Agrocampus Ouest-INRA (USC 1378), Rennes, France

* Vincent.Rioux@agrocampus-ouest.fr



OPEN ACCESS

Citation: Lemarié F, Beauchamp E, Dayot S, Duby C, Legrand P, Rioux V (2015) Dietary Caprylic Acid (C8:0) Does Not Increase Plasma Acylated Ghrelin but Decreases Plasma Unacylated Ghrelin in the Rat. PLoS ONE 10(7): e0133600. doi:10.1371/journal.pone.0133600

Editor: François Blachier, National Institute of Agronomic Research, FRANCE

Received: March 13, 2015

Accepted: June 30, 2015

Published: July 21, 2015

Copyright: © 2015 Lemarié et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by grants from the CNIEL (Comité National Interprofessionnel de l'Economie Laitière). The funders had no role in data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors declare that this work was partly supported by research grants from the French Dairy Council. This does not alter the

Abstract

Focusing on the caprylic acid (C8:0), this study aimed at investigating the discrepancy between the formerly described beneficial effects of dietary medium chain fatty acids on body weight loss and the C8:0 newly reported effect on food intake *via* ghrelin octanoylation. During 6 weeks, Sprague-Dawley male rats were fed with three dietary C8:0 levels (0, 8 and 21% of fatty acids) in three experimental conditions (moderate fat, caloric restriction and high fat). A specific dose-response enrichment of the stomach tissue C8:0 was observed as a function of dietary C8:0, supporting the hypothesis of an early preduodenal hydrolysis of medium chain triglycerides and a direct absorption at the gastric level. However, the octanoylated ghrelin concentration in the plasma was unchanged in spite of the increased C8:0 availability. A reproducible decrease in the plasma concentration of unacylated ghrelin was observed, which was consistent with a decrease in the stomach preproghrelin mRNA and stomach ghrelin expression. The concomitant decrease of the plasma unacylated ghrelin and the stability of its acylated form resulted in a significant increase in the acylated/total ghrelin ratio which had no effect on body weight gain or total dietary consumption. This enhanced ratio measured in rats consuming C8:0 was however suspected to increase (i) growth hormone (GH) secretion as an increase in the GH-dependent mRNA expression of the insulin like growth Factor 1 (IGF-1) was measured (ii) adipocyte diameters in subcutaneous adipose tissue without an increase in the fat pad mass. Altogether, these results show that daily feeding with diets containing C8:0 increased the C8:0 level in the stomach more than all the other tissues, affecting the acylated/total ghrelin plasma ratio by decreasing the concentration of circulating unacylated ghrelin. However, these modifications were not associated with increased body weight or food consumption.

authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

Caprylic acid (octanoic acid, C8:0) belongs to the class of medium-chain saturated fatty acids (MCFAs) which also includes caproic acid (C6:0) and capric acid (C10:0). MCFAs are characteristic nutrients present in dairy products [1] and in specific oils like palm kernel and coconut oils [2]. They display physical and metabolic properties that are distinct from those of long-chain saturated fatty acids (LCFAs ≥ 12 carbons), leading therefore to distinct physiological effects [3]. First, part of MCFAs coming from dietary medium chain triglycerides (MCTs) can be released early during digestion through the action of preduodenal lipase [4], leading to their potential and yet not clearly quantified direct absorption by the stomach mucosa [5,6]. Second, MCFAs which have escaped the absorption at the gastric level are absorbed by small intestinal cells, like LCFAs, after the subsequent action of duodenal pancreatic lipase on both dietary remaining MCTs and long chain triglycerides (LCTs). However, unlike LCFAs which are re-esterified with 2-monoglycerides into triglycerides and incorporated into chylomicrons which enter the lymphatic system, MCFAs are directly transferred to the portal circulation and transported as free fatty acids (FFAs) with albumin to the liver [7]. Third, once in the liver, MCFAs are rapidly subjected to mitochondrial beta-oxidation [8], since they easily enter the mitochondria independently of the carnitine transport system, as opposed to LCFAs [9].

These metabolic properties of MCFAs (rapid gastro-intestinal hydrolysis and absorption, specific transport through the portal vein and rapid beta-oxidation in the liver) lead to a high catabolism and low tissue storage especially in adipose tissue [10]. Dietary MCFAs have therefore been associated with beneficial physiological effects compared with LCFAs. Indeed, a diminished deposition of fat was reported in rats overfed with MCT diets compared with LCT diets [11–13]. In overweight humans, intakes of equal-caloric diets rich in MCFAs were shown to decrease adiposity and increase energy expenditure compared to similar diets rich in LCFAs [14,15]. Regarding other physiological parameters, epidemiological studies have also shown that intakes of short to medium-chain saturated fatty acids were not significantly associated with the risk of coronary heart disease (CHD) [16].

However, more recently, caprylic acid was also shown to specifically acylate ghrelin [17], the only known peptide hormone with an orexigenic effect. Ghrelin is a 28 amino acid peptide expressed mainly in the different sections of the digestive tract and especially the stomach [18]. Acylated ghrelin binds to the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHSR-1a) located in the pituitary gland and hypothalamus [19,20] and regulates many relevant biological processes including the secretion of the growth hormone (GH), the stimulation of appetite and food intake, the modulation of gastric acid secretion and motility and the regulation of glucose homeostasis and adiposity [21]. Ghrelin seems to have an essential function in blood glucose regulation in case of calorie restriction [22], even if the mechanisms mediating this effect remain poorly understood. During its maturation in the gastric mucosa and before secretion in the blood, part of the proghrelin is subjected to a unique modification consisting in the addition of an activated caprylic acyl-coA to the 3rd serine residue. The ghrelin O-acyltransferase (GOAT or MBOAT4), the gastric enzyme involved in ghrelin octanoylation, belongs to the family of membrane bound O-acyltransferases (MBOAT), a group of proteins involved in acetyltransferase and acyltransferase activity [23,24]. Plasma ghrelin exists therefore in both unacylated and acylated forms, but only the latter can bind its GHSR-1a receptor. Because of the above-mentioned potential specific gastric absorption of MCFAs following the consumption of MCTs, dietary caprylic acid is now suspected to directly provide GOAT enzyme with octanoyl-CoA co-substrate necessary for the acyl modification of ghrelin. Indeed, ingestion by mice of either MCFAs or MCTs increased the stomach concentration of acylated ghrelin [25], without changing the total ghrelin amount. Using murine genetic models, Kirchner et al. [26] also

suggested that GOAT was required to mediate the impact of dietary MCTs on body adiposity. Recent studies have suggested that GOAT might be a therapeutic target against obesity and hyperphagia by inhibiting the GOAT activity [27], in order to decrease the circulating level of acylated ghrelin (which may also be obtained by limiting the availability of its substrate C8:0) [27].

Altogether, these data support contradictory physiological effects of dietary caprylic acid on body weight and food consumption. We therefore wanted to clarify the discrepancy between the historically described beneficial effects of dietary MCFAs including C8:0 on body weight and fat loss and its newly reported effect on food consumption and appetite stimulation *via* ghrelin acylation. The purpose were to (i) define the origin of caprylic acid which is used to acylate ghrelin in the stomach, (ii) study the effect of increasing dietary caprylic acid levels on the C8:0 available in the stomach and other tissues, (iii) analyze the subsequent effect of increasing dietary caprylic acid levels on the concentration of circulating plasma acylated and non-acylated ghrelin, (iv) study the whole effect of increasing dietary caprylic acid levels on dietary consumption, body weight and on other parameters such as adiposity. Here, we showed that dietary C8:0 led to a specific dose-response enrichment of C8:0 in the stomach tissue. However, this increased C8:0 availability did not affect the plasma acylated ghrelin concentration but decreased the plasma unacylated ghrelin concentration.

Materials and Methods

Chemicals

Solvents and chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) or Thermo Fisher Scientific (Elancourt, France). Tricaprylin was from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). Tripalmitin was from Sigma. Rat plasma acylated and unacylated ghrelin enzyme immunoassays kits (EIA) were purchased from SPI-Bio (Montigny Le Bretonneux, France). Kits for plasma glucose, cholesterol and triglycerides were purchased from Bio-mérieux (Lyon, France). Rabbit anti-ghrelin polyclonal antibodies (bs-0467R) used for immunohistochemistry were purchased from Bioss (Massachusetts, USA).

Diets

Three different lipid mixes (Table 1) were prepared with commercial oils (olive, rapeseed, palm, corn and flaxseed oils) and increasing amounts of caprylic acid (0, 8 and 21% of FAs) in the form of tricaprylin substituted with decreasing amounts of palmitic acid (30, 20 and 7.5% of FAs) in the form of tripalmitin. These lipid mixes were used to prepare diets containing either moderate amounts of fat called MF diets (10% in mass, *i.e.* 21% of total energy), or high amounts of fat called HF diets (25% in mass, *i.e.* 45% of total energy), at the Unité de Production d'Aliments Expérimentaux (INRA, Jouy en Josas, France). The three MF diets (MF-0, MF-8 and MF-21) also contained 42.2% of starch, 21.1% of sucrose, 19.9% of casein, 1.8% of cellulose, 4.1% of mineral mix and 0.9% of vitamin mix. These MF diets were isoenergetic (423 kcal/100 g) and contained the same amount of total saturated fatty acids (SFAs), caprylic acid representing 0, 1.7 and 4.4% of total energy, respectively. The MF diets were provided *ad libitum* to the rats but also as calorie restricted rations (CR diets) corresponding to 70% of *ad libitum* and thereafter called CR-0, CR-8 and CR-21 diets. Finally, in the three HF diets (HF-0, HF-8 and HF-21) containing 25% in mass of fat, the increase in fat level was counterbalanced with a decrease in starch (32.2%) and sucrose (16.1%). These HF diets were also isoenergetic (498 kcal/100 g), caprylic acid representing 0, 3.6 and 9.5% of total energy, respectively.

Table 1. Fat mixture and fatty acid composition (% of FAs) of the experimental lipid blends containing increasing levels of caprylic acid (C8:0).

	Diet-0%	Diet-8%	Diet-21%
Fat (%)			
Olive Oil	47.0	48.3	50.0
Rapeseed Oil	0.0	0.0	10.0
Palm Oil	19.0	17.0	0.0
Corn Oil	13.5	13.5	13.3
Flaxseed Oil	5.5	5.5	3.7
Tricaprylin	0.0	10.0	23.0
Tripalmitin	14.7	5.7	0.0
FA (% of FAs)			
C8:0	0.0	8.4	20.6
C12:0	0.1	0.1	0.0
C14:0	0.3	0.3	0.0
C16:0	30.0	19.8	7.6
C18:0	3.1	2.9	2.2
C20:0	0.3	0.3	0.3
C22:0	0.0	0.1	0.1
ΣSFA¹	33.8	31.8	30.9
C16:1 (n-9)	0.0	0.1	0.1
C16:1 (n-7)	0.4	0.4	0.4
C18:1 (n-9)	47.7	49.3	49.9
C18:1 (n-7)	1.7	1.6	1.9
C20:1 (n-9)	0.2	0.2	0.3
ΣMUFA¹	50.0	51.5	52.5
C18:2 (n-6)	12.7	13.2	13.1
C18:3 (n-3)	3.5	3.5	3.5
ΣPUFA¹	50.0	51.5	52.5
<i>C18:2/C18:3 ratio</i>	3.7	3.8	3.8

The three different lipid mixes were used for preparing the MF, CR and HF diets.

¹ΣSFA, ΣMUFA and ΣPUFA correspond respectively to the sum of saturated, mono-unsaturated and poly-unsaturated fatty acids.

doi:10.1371/journal.pone.0133600.t001

Animals

All protocols complied with the European Union Guideline for animal care and use (2003/35/CEE). The experimental procedure (n°01374.02) was approved by the French Animal Care Committee (Rennes) and the Ministry of Higher Education and Research, in compliance with recommendations of the 2013–118 directive for animal experimentation. Forty five Sprague-Dawley male rats (60 g weight) were purchased from Janvier breeding center (Le Genest Saint Isle, France). Eighteen rats were randomly distributed to 3 groups (n = 6) and fed *ad libitum* with the three MF diets (MF-0, MF-8 and MF-21). As mentioned above, three other groups of rats (n = 3) received the same MF diets restricted to 70% of *ad libitum* and were called CR groups (CR-0, CR-8 and CR-21). The n value of the CR groups was limited to 3 rats due to housing restriction. Finally, three other groups of rats (n = 6) were fed *ad libitum* with the HF diets (HF-0, HF-8 and HF-21). The nine different groups of rats were fed during 6 weeks with the experimental diets. They had free access to water. Rats were housed in groups of two (MF and HF diets) or alone (CR diets) at 19°C-23°C with a 12 h light-dark cycle.

Animal weight and food consumption were measured daily. Blood samples were collected every week starting from the second week of diets (between 8 and 11 am) in the tail vein alternatively on 18 h fasted (2nd and 4th weeks) or fed state (3rd and 5th weeks) in order to measure the plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations. For ethical reasons, rats already under chronic calorie restriction were not additionally deprived of food and no results are therefore presented for the CR group under fasted conditions. After 6 weeks of experiment, rats were anesthetized following an overnight fast with an intraperitoneal injection of pentobarbital (140 mg/kg) (Merial, Lyon, France) and blood samples were collected by cardiac punctures. The liver, the brain, the mesenteric and the subcutaneous adipose tissues were removed, weighted, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Sections of subcutaneous adipose tissues were directly fixed in formalin for morphometric analysis. The intestine (duodenum, jejunum and ileum) was emptied, rinsed with ice-cold saline solution, snap-frozen and stored at -80°C. The stomach was subsequently removed and treated similarly. Stomach longitudinal sections were collected and fixed in formalin for immunohistology.

Measurement of the plasma acylated and unacylated ghrelin

Blood samples collected in the tail vein were immediately mixed with EDTA (1 mg/ml plasma) and with the serine protease inhibitor p-hydroxymercuribenzoic acid (PHMB, 0.4 μM final) to protect the acylated ghrelin from enzymatic degradation [28]. The plasma was rapidly separated from the blood cells by centrifugation and acidified by adding HCl (0.1 N final) to preserve ghrelin acylation, as well. Samples were then stored at -80°C for later hormone titration. The acylated and unacylated ghrelin concentrations were assayed with the commercial EIA kits [29] according to the manufacturer's instructions.

Analysis of the other plasma parameters

The plasma collected by cardiac punctures at the end of the experiment was separated from the blood cells by centrifugation. Plasma glucose, cholesterol and TG were assayed with commercial enzymatic kits [30] according to the manufacturer's instructions.

Lipid extraction and FA analysis

Lipids from liver, stomach, duodenum, jejunum, ileum, epididymal, mesenteric and subcutaneous adipose tissues were extracted using a mixture of dimetoxymethane/methanol (4:1 v/v) after homogenization with an Ultra-Turrax as previously described [31]. Lipids from plasma were extracted with a mixture of hexane/isopropanol (3:2 v/v), after acidification with 1 ml HCl 3 M [32]. Pelargonic acid (C9:0) and margaric acid (C17:0) were added as internal standards in order to quantify MCFAs (with C9:0) and LCFAs (with C17:0). Total lipid extracts were saponified for 30 min at 70°C with 1 ml of 0.5 M NaOH in methanol and methylated with 1 ml BF₃ (14% in methanol) for 15 min at 70°C. To protect the presence of volatile short and medium chain FAs, FA methyl esters (FAMES) were extracted by adding 1 ml hexane and 5 ml NaCl 0.9% in deionized water [33]. After shaking, the hexane phase was directly analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) [34] using an Agilent Technologies 7890N (BiosAnalytic, Toulouse, France) with a split injector (10:1) at 250°C and a bonded silica capillary column (BPX70, 60 m × 0.25 mm, SGE, Villeneuve-St-Georges, France). The column temperature program started at 45°C and stayed at this temperature for 3 min in order to analyze MCFAs. Then, the temperature ramped firstly at 10°C/min to 150°C, then at 1.4°C/min to 220°C and at 40°C/min to 260°C and held at 260°C for 2 min.

Table 2. Primers designed for quantitative RT-PCR analysis of rat genes.

Genes	Preproghrelin (PPG)	Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)	Growth hormone secretagogue receptor-1a (GHSR-1a)
Species	rat	rat	rat
GenBank Acc. no.	NM_021669.2	NM_001082479.1	NM_032075.3
Forward primer	TGGCATCAAGCTGTCAGGAG	AGTTCGTGTGTGGACCAAGG	GCCATCTGCTTCCCTCTG
Reverse primer	GGCAGAAGCTGGATGTGAGT	GGTGACGTGGCATTCTTCTGT	ATCTGTGCCGTTTTCTGTG
Amplicon size bp	171	312	144

doi:10.1371/journal.pone.0133600.t002

Quantification of mRNA expression by Real-Time PCR

Total RNA was extracted from stomach, hypothalamo-pituitary complex, mesenteric adipose tissue and liver with Trizol. RNA was converted into cDNA with the IScriptcDNA synthesis kit (Bio-Rad) according to the supplier’s instructions. RNA was quantified by real-time qPCR with the SsoFast EvaGreen supermix (Bio-Rad) containing 50 ng of retrotranscribed RNA, 300 nM of Forward primers and 300 nM of Reverse primers and 10 µl SsoFast EvaGreen supermix. The sequences of primers were designed as described in Table 2. Quantitative real-time PCR was done in optical 96-well plates on a CFX 96 real-time PCR Detection System (BioRad) as follows: 30 s at 95°C, 40 cycles of 5 s at 95°C and 5 s at 55°C. The 18S mRNA level was quantified as an endogenous control.

Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT, MBOAT4) mRNA was quantified by Real-Time PCR with the Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem) containing 40 ng of retrotranscribed RNA, 0.5 µM of primers and 0.25 µM of Taqman probe. Primers and 5'-FAM/TAMRA-3' Taqman probes specific to GOAT gene were designed (forward primer 5'-gggccaggtacctcttctc-3'; reverse primer 5'-cggccaaagccaggacacct-3') and Taqman probe (5'-FAM-aaatgagcagagcgtagga-TAMRA3'). Amplification was performed by an ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) over 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The 18S gene expression was quantified as an endogenous control using the 18S RNA Control kit Yakima-Yellow Eclipse Dark Quencher (Eurogentec) and relative gene expression was determined from the cycle thresholds (Ct) using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Determination of adipocyte size (morphometric analysis)

Subcutaneous adipose tissue was fixed with 4% buffered formalin, pH 7.4, during 1 week at 4°C and embedded in paraffin [35,36]. Three 4 µm sections per rat shifted by 150 µm were cut using a microtome LEICA (Milton Keynes, UK) and the sections were mounted onto glass slides and stained in Hemalun-Eosin-Safran (H.E.S). The adipocyte areas were manually traced and analyzed using the NIS Elements software. Adipocyte diameter, area and perimeter were calculated for 5 separate photographs per tissue sections. These data were used to calculate the frequency distribution of adipocyte diameters and the mean diameter.

Immunohistochemistry

Longitudinal stomach sections were fixed with 4% buffered formalin, pH 7.4, during 24 hours and embedded in paraffin [37]. Paraffin-embedded tissue was cut at 4 µm and slides were mounted onto glass slides. Immunohistochemistry was performed with rabbit polyclonal ghrelin (acylated and unacylated) antibodies, targeting an amino-acid sequence of the ghrelin which does not include the octanoylation site. Immunohistochemical staining was performed on Automated IHC stainer using the LEICA ST502. The signal was counted using the NIS elements software.

Statistical analysis

Statistical analyses were realized using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Group differences were analyzed by the non-parametric Kruskal-Wallis test with the Dunn's post-tests or with non-parametric Mann-Whitney test to compare the amount of C8:0 between two sections of the stomach. A two-way ANOVA (not repeated measures) was used to analyze the effect of the diet and the localization in the stomach (fundus or corpus) on the C8:0 availability, and the effect of the tricaprylin on the frequency distribution of adipocyte diameter. Body weight gain was analyzed using the two-way ANOVA with repeated measures. All Data are expressed as the mean \pm SEM and for all tests, $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results

C8:0 availability in the stomach, intestine and other tissues

The effect of dietary C8:0 (0, 8 and 21% of FAs) was studied in rats subjected to three different treatments: *ad libitum* Moderate Fat (MF) diet, Calorie Restricted (CR) diet (70% of MF *ad libitum* energy intake) and *ad libitum* High Fat (HF) diet. The composition of total FAs was analyzed in several tissues to determine the metabolic fate of dietary C8:0. The amount of C8:0 expressed as % of FAs in the tissues of MF rats is shown in Table 3. Regardless its amount in the diets, no C8:0 was detected in the plasma and in the liver of rats consuming the MF diets. In adipose tissues, the amount of C8:0 significantly increased with the level of dietary C8:0 but only reached about 0.3% of total FAs in the MF-21 group. In the stomach tissue, a clear dose-response enrichment of C8:0 was observed. Interestingly, even if no C8:0 was present in the MF-0 diet, a very low but detectable amount of this specific FA was found in the stomach tissue. In the stomach of the MF-8 and MF-21 rats, the percentage of C8:0 (in % of FAs) was 3 to 4-fold greater than in adipose tissues of the same animals. Although lower than in the stomach, a dose-dependent increase in C8:0 concentration was also observed in the first sections of the intestine (duodenum and jejunum). Finally, the FA analysis of the two parts of the stomach

Table 3. Effect of dietary tricaprylin (0, 8, 21% of FAs) in the MF groups on the C8:0 availability in different tissues.

Diets	C8:0 in % FA			K-W test
	MF-0	MF-8	MF-21	
Plasma	n.d. ¹	n.d.	n.d.	n.s. ²
Liver	n.d.	n.d.	n.d.	n.s.
Mesenteric adipose tissue	n.d.	0.15 \pm 0.00	0.25 \pm 0.01	*
Subcutaneous adipose tissue	n.d.	0.15 \pm 0.01	0.26 \pm 0.02	
Epididymal adipose tissue	n.d.	0.19 \pm 0.01	0.32 \pm 0.01	*
Stomach	0.07 \pm 0.03	0.48 \pm 0.07	1.22 \pm 0.25	**
Duodenum	n.d.	0.14 \pm 0.01	0.43 \pm 0.09	*
Jejunum	n.d.	0.12 \pm 0.03	0.30 \pm 0.12	n.s.
Ileum	n.d.	n.d.	n.d.	n.s.

Results are expressed as mean \pm SEM in % of FAs in the tissues. Kruskal-Wallis test (K-W test)

* $P < 0.05$

** $P < 0.01$.

¹ not detected.

² statistically not significant.

doi:10.1371/journal.pone.0133600.t003

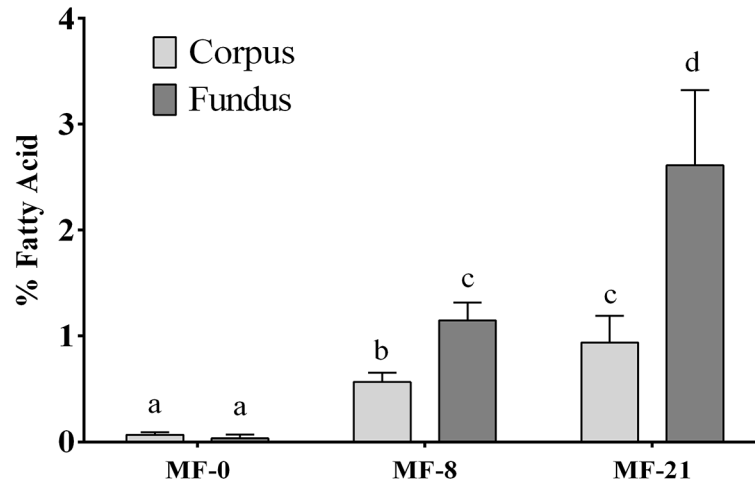


Fig 1. Effect of dietary tricaprylin level on C8:0 availability in the stomach tissue in the MF groups. The stomach tissue was dissected and the fatty acids of the fundus and corpus were analyzed. The C8:0 available in the different parts of the stomach is expressed as mean \pm SEM in % of FAs in the tissues. The effect of the diet and the localization in the stomach tissue was analyzed using two-way ANOVA: (i) effect of the diet on C8:0 availability, $P < 0.0001$; (ii) effect of the part of the stomach tissue studied on C8:0 availability, $P = 0.0092$; (iii) interaction between the two factors, $P = 0.0387$.

doi:10.1371/journal.pone.0133600.g001

(fundus and corpus) was realized in the MF groups (Fig 1) and showed again a dose-dependent increase in C8:0, the level of C8:0 being significantly higher in the fundus than in the corpus.

Concerning palmitic acid (S1 Table), the higher level of dietary C16:0 in MF-0 rats led to a significant increase in the % of C16:0 only in mesenteric and subcutaneous adipose tissues, compared to MF-8 and MF-21 rats. The lower intake in palmitic acid in MF-8 and 21 diets was likely compensated by an increased endogenous synthesis of this FA.

Plasma acylated and unacylated ghrelin

Under fed conditions. The plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations were measured in the blood collected on rats under fed conditions after 3 and 5 weeks on the experimental diets (Fig 2). The plasma total ghrelin was calculated by adding the acylated and unacylated ghrelin concentrations. After 3 weeks (Fig 2A) and 5 weeks (Fig 2B), the acylated ghrelin concentration was not modified by the dietary C8:0 levels. Conversely the concentration of unacylated ghrelin was significantly lower in the MF-8 and MF-21 groups than in the control group after 3 weeks (Fig 2A) and significantly lower in the MF-21 group than in the control group after 5 weeks (Fig 2B). Due to the lower levels of unacylated ghrelin, the total ghrelin concentration was also decreased when C8:0 was present in the diets. As a consequence, the acylated to total ghrelin ratios were significantly higher (Fig 2C) in the MF-8 and MF-21 groups than in the control group after 3 weeks and significantly higher in the MF-21 group compared with the control group with intermediate level for the MF-8 group after 5 weeks (Fig 2D).

Plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations were similarly measured in the blood collected on fed rats of the HF groups (S1 Fig). Once again, no effect of dietary C8:0 was shown on the acylated ghrelin concentrations but a significantly lower level of unacylated ghrelin concentrations was detected in the HF-21 group than the HF-0 group. In the CR groups, the C8:0 dietary level did not modify significantly the concentration of acylated and unacylated ghrelin whatever the diet duration (S2 Fig).

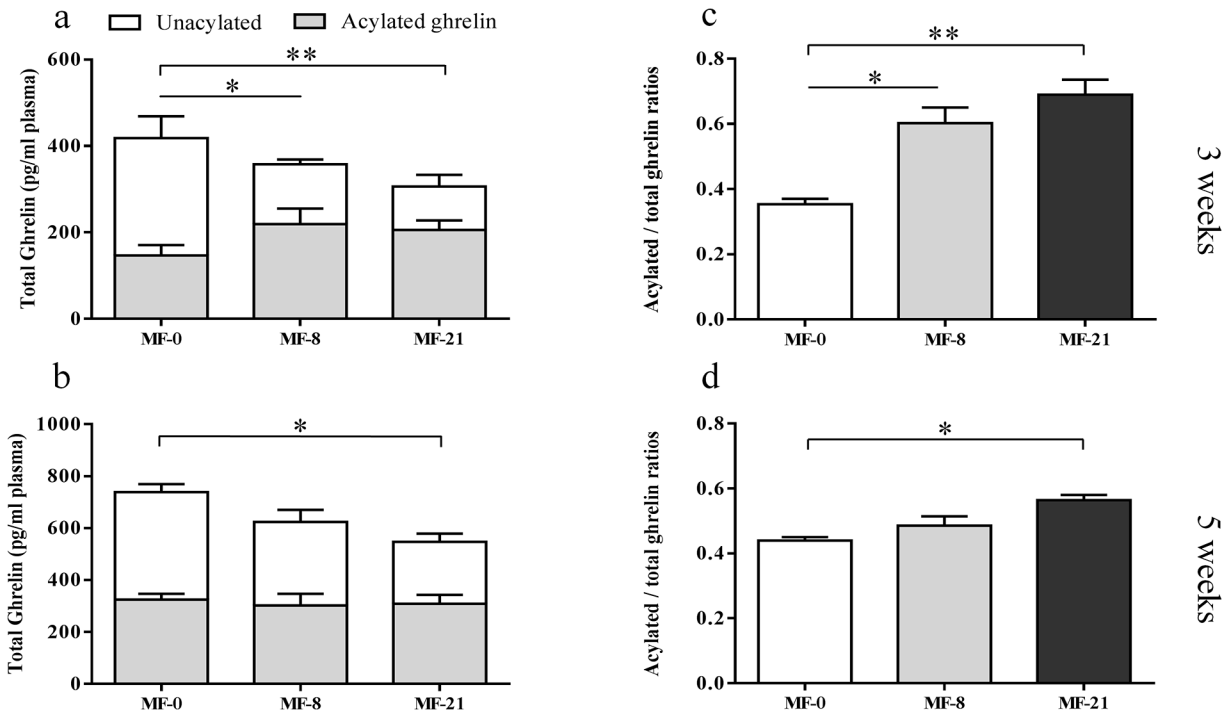


Fig 2. Effect of dietary tricaprylin level on the plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations, in the MF groups (fed state). (a) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 3 weeks of diet. Kruskal-Wallis test (K-W): (i) acylated ghrelin, $P = 0.44$; (ii) unacylated ghrelin, $P = 0.0018$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; (iii) total ghrelin, $P = 0.5824$. (b) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 5 weeks of diet. K-W test: (i) acylated ghrelin, $P = 0.56$; (ii) unacylated ghrelin, $P = 0.029$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$; (iii) total ghrelin, $P = 0.127$. (c) Acylated/total ghrelin ratios after 3 weeks of diet. K-W test: $P = 0.006$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. (d) Acylated/total ghrelin ratios after 5 weeks of diet. K-W test: $P = 0.0103$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0133600.g002

Under fasted conditions. The plasma acylated and unacylated ghrelin concentrations were also measured in the blood collected on rats under fasted conditions after 2 and 4 weeks on the experimental diets (Fig 3). Fig 3A and 3B show that the concentrations of both acylated and unacylated ghrelin were significantly higher when MF rats were under fasted conditions than under fed conditions (Fig 2). Whatever the diet duration, the plasma acylated ghrelin concentration was not significantly modified by the consumption of C8:0. After 2 weeks, the unacylated ghrelin concentration was significantly lower in the MF-21 than in MF-0 group (Fig 3A), as already shown under fed conditions. A similar but not significant downward trend was shown after 4 weeks (Fig 3B). Consequently, a significant increase in the acylated/total ghrelin ratio was shown after 2 weeks between the MF-8 and MF-0 (Fig 3C), but this effect disappeared gradually after longer dietary periods (Fig 3D), as also shown previously under fed conditions.

Concerning the rats of the HF groups under fasted conditions (S3 Fig) no significant effect of the C8:0 dietary level was shown after 2 and 4 weeks on acylated or unacylated ghrelin concentrations.

Stomach PPG mRNA level and ghrelin peptide expression

The stomach mRNA level of preproghrelin (PPG) gene was measured in the MF groups (Fig 4A) showing a linear decrease when dietary C8:0 increased. The expression level of ghrelin peptide was quantified by immunochemistry in longitudinal sections of gastric mucosa for the MF groups (Fig 4B and 4C) and the signal was measured in the corpus. The percent of cells

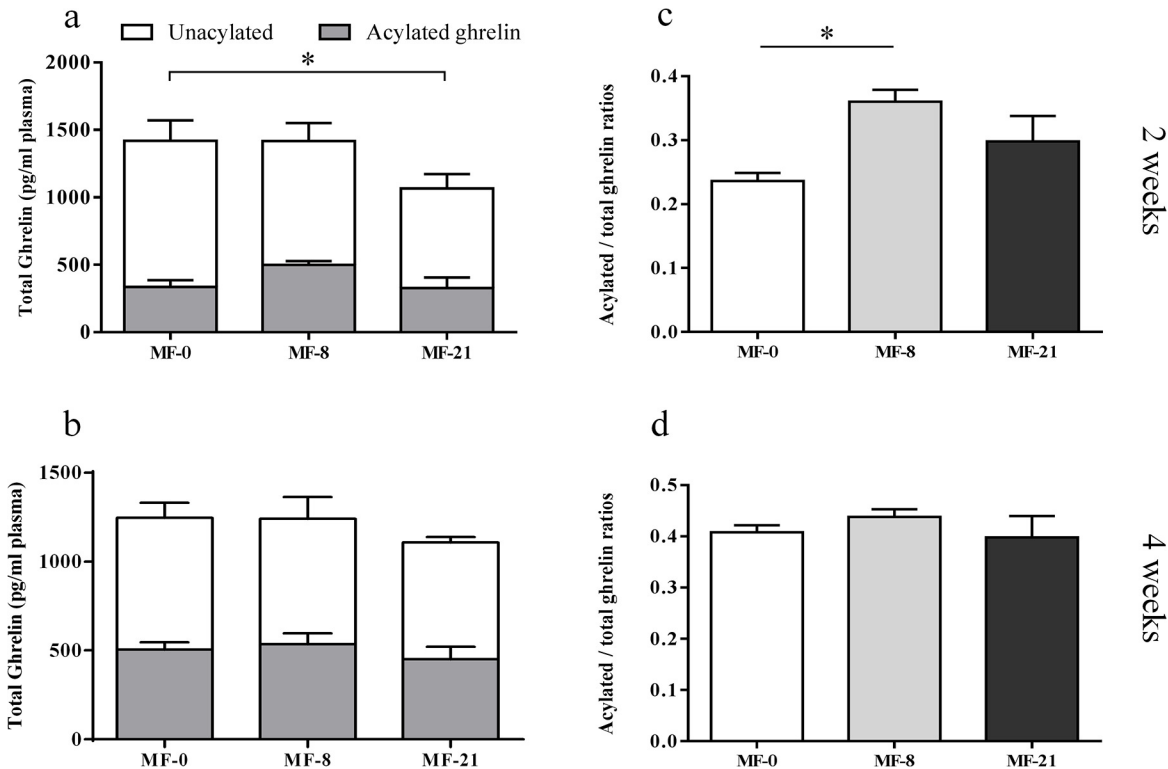


Fig 3. Effect of dietary tricaprylin level on the acylated and unacylated ghrelin concentrations, in the MF groups (fasted state). (a) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 2 weeks of diet. Kruskal-Wallis test (K-W): (i) acylated ghrelin, $P = 0.0837$; (ii) unacylated ghrelin, $P = 0.038$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$; (iii) total ghrelin, $P = 0.2345$. (b) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 4 weeks of diet. K-W test: (i) acylated ghrelin, $P = 0.4585$; (ii) unacylated ghrelin, $P = 0.5643$; (iii) total ghrelin, $P = 0.65$. (c) Acylated/total ghrelin ratios after 2 weeks of diet. K-W test: $P = 0.0181$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$. (d) Acylated/total ghrelin ratios after 4 weeks of diet. K-W test: $P = 0.3635$.

doi:10.1371/journal.pone.0133600.g003

expressing ghrelin in the corpus was higher in the MF-0 group (0.9% of total cell in the mucosa) than in MF-8 or MF-21 groups (0.6% and 0.7% respectively) ($P < 0.01$). The stomach mRNA level of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) gene was also measured in the MF groups (S4 Fig) showing no significant effect of dietary C8:0 on the enzyme expression.

Analysis of parameters putatively controlled by plasma ghrelin

Body weight and dietary consumption. In the MF groups, no significant differences on body weight gain, final body weight and cumulative energy intakes were observed (Fig 5A, 5B and 5C). In the CR-groups and HF groups (S5 Fig) no effect of the level of C8:0 was shown on the weight gain and energy intake.

Fat mass and adiposity. Because adipose tissues are target organs for ghrelin [38] and are also influenced by consumption of FAs, the impact of the diets on fat pad masses and on histological parameters of subcutaneous adipose tissues was studied. Fat pad masses were measured for several adipose tissues (mesenteric, epididymal, subcutaneous, retroperitoneal and perirenal) in rats fed with the MF, CR and HF diets and no significant differences were observed (S6 Fig). In the subcutaneous adipose tissue of the MF rats, Fig 6 shows that rats consuming both the MF-8 and -21 diets exhibited an increased frequency of larger adipocytes compared with the control group. As a consequence, the mean adipocyte size (Fig 6B) in the subcutaneous fat of rats fed with both MF-8 and MF-21 (respectively $63 \pm 2 \mu\text{m}$ and $63 \pm 2 \mu\text{m}$) was significantly larger than in rats fed with the control diet ($54 \pm 1 \mu\text{m}$) ($P < 0.0001$).

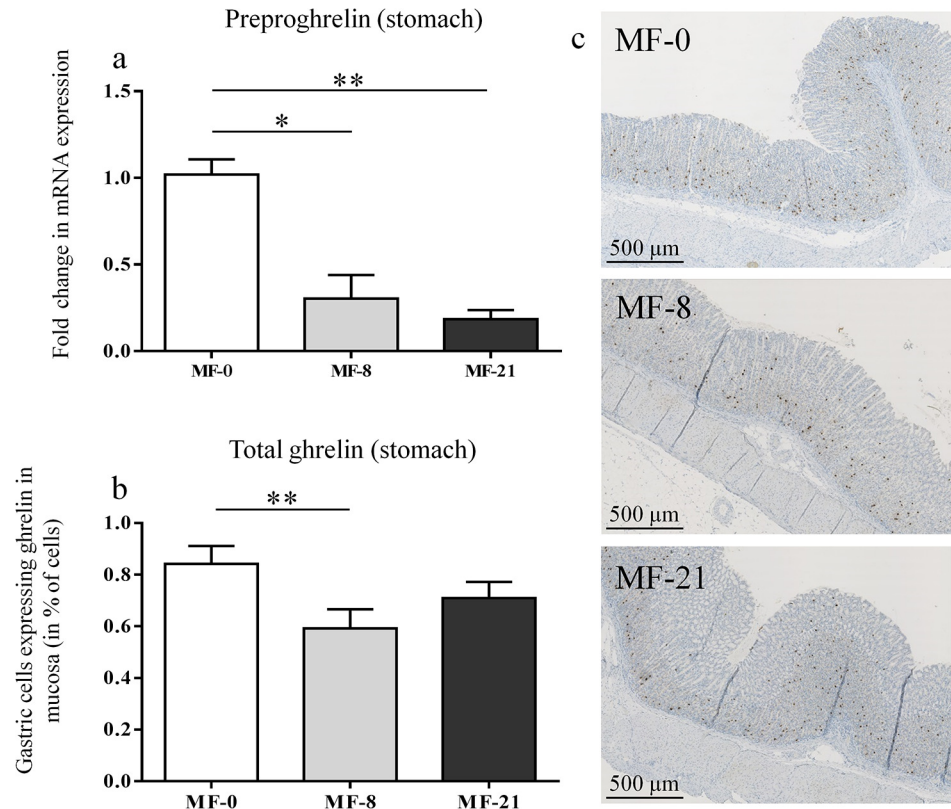


Fig 4. Effect of tricaprylin on total ghrelin expression in the MF groups. (a) Preproghrelin mRNA level (in fold change of the control MF-0) in the stomach tissue. Kruskal-Wallis (K-W) test: $P = 0.004$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. (b) Quantification of total ghrelin staining in the gastric mucosa of the corpus. K-W test: $P = 0.017$, Dunn's post tests, $**P < 0.01$. (c) Ghrelin staining in gastric mucosa of MF-0, MF-8 and MF-21 groups.

doi:10.1371/journal.pone.0133600.g004

Plasma parameters. The results obtained by measuring TG, total CH and glucose in plasma collected at the sacrifice are presented in [S2 Table](#). In the MF groups, no effect of increasing dietary amounts of C8:0 was shown on these plasma parameters. The CR and HF rats also displayed the same triglyceridemia and glycemia between groups receiving dietary C8:0 and control groups.

Liver IGF-1 and pituitary GHSR-1a mRNA levels. The liver mRNA level of the IGF-1 gene ([Fig 7](#)) was analyzed because it is directly influenced by the GH secretion, itself regulated by the acylated ghrelin *via* its binding to GHSR-1a receptor [39]. The expression was higher in both MF-8 and MF-21 groups than in the control group, with a significant effect between MF-21 and MF-0 rats. The analysis of the mRNA level of GHSR-1a gene in the hypothalamo-pituitary complex did not show any difference of expression between the MF rats (data not shown).

Discussion

The discovery of ghrelin as the endogenous ligand of GHSR-1a receptor [17] and the description of its GOAT-catalyzed essential post-translational octanoylation [23,24] brought to light a new issue which is to understand the physiological functions regulated by dietary C8:0. The present study aimed at describing the effect of moderate to high dietary enrichment in caprylic acid on several physiological parameters which may be either directly regulated by C8:0, since MCFAs have specific metabolic properties, or indirectly by its ability to acylate the ghrelin. The

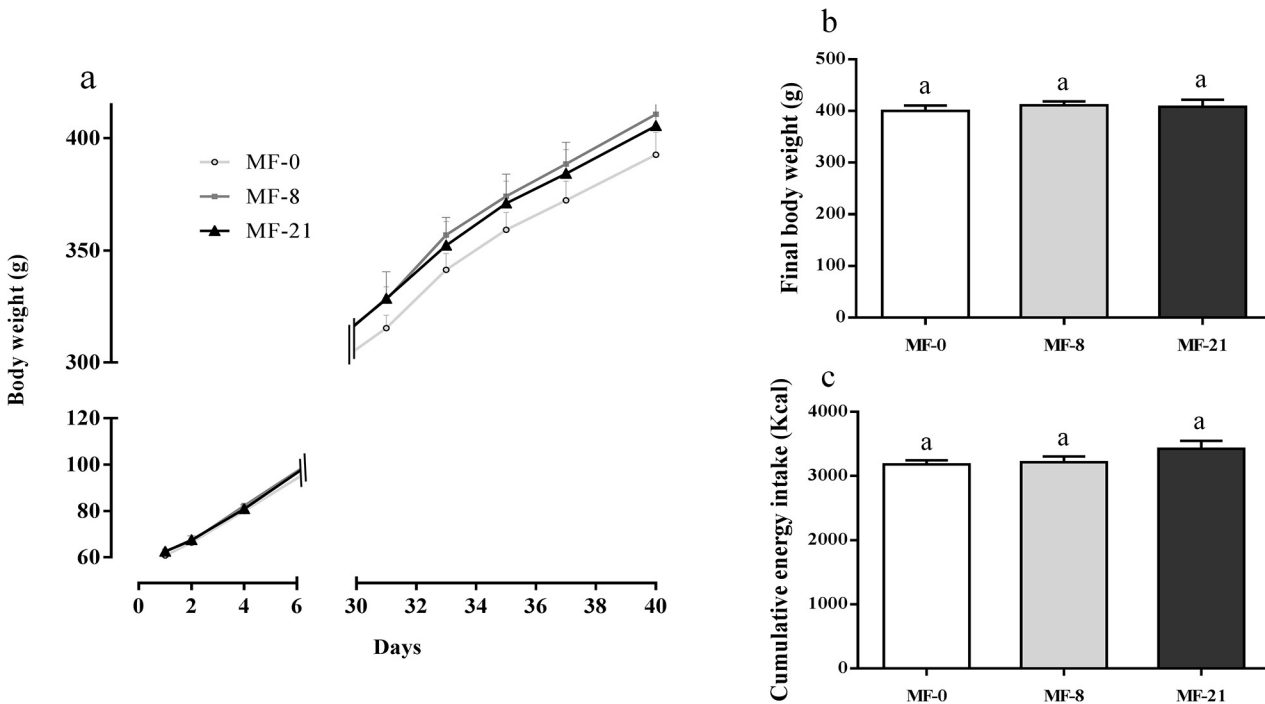


Fig 5. Effect of tricaprylin on body weight gain and food intake in the MF groups. (a) Body weight gain in gram. Two-way repeated measurement ANOVA: effect of the diet, $P = 0.5275$. (b) Final body weight in gram; Kruskal-Wallis (K-W) test: $P = 0.9098$. (c) Cumulative energy intakes in kcal. K-W test: $P = 0.3393$. Results are expressed as mean \pm SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0133600.g005

animals received three dietary caprylic acid levels (0, 8 and 21% of FAs) in three different nutritional conditions (moderate fat, caloric restriction and high fat). The rationale for such an experimental design was to exacerbate the potential effects of dietary caprylic acid in different nutritional conditions. Indeed, it has been shown in Goat(-/-) mice that the GOAT-ghrelin axis helped to regulate glucose homeostasis in case of prolonged calorie restriction [22,40]. In addition, it is known that the nutritional conditions influence the concentrations of acylated and unacylated ghrelin [26,41]. Except the substitution with decreasing levels of the long chain

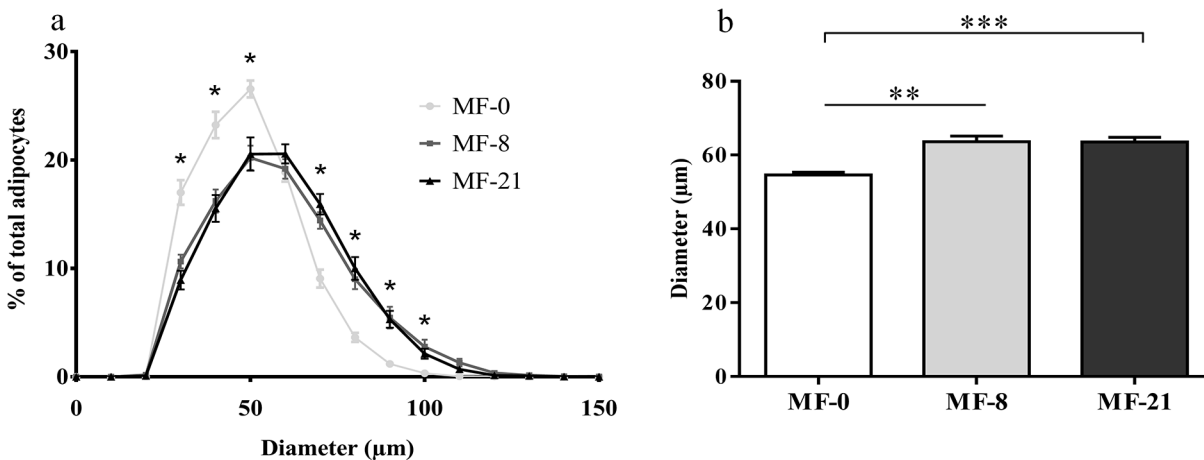


Fig 6. Effect of tricaprylin in the MF groups on adiposity. (a) Frequency distribution of adipocyte diameter (μm). (b) Adipocyte diameter (μm), K-W test, $**P < 0.01$, Dunn's $***P < 0.001$. Results are expressed as mean \pm SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0133600.g006

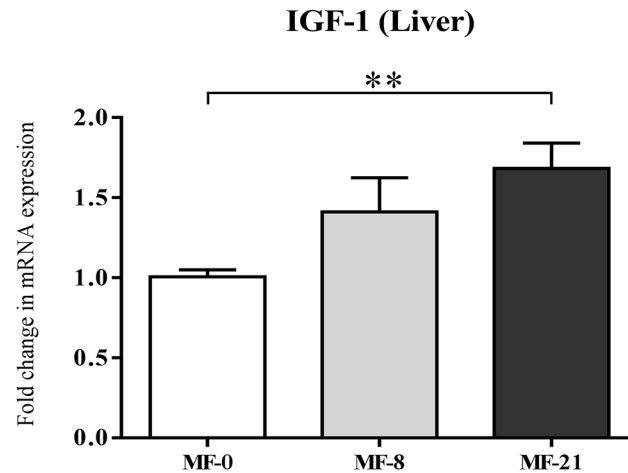


Fig 7. Effect of C8:0 in the MF groups on liver IGF-1 expression. IGF-1 mRNA level (in fold change). K-W test, $P = 0.009$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$. Results are expressed as mean \pm SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0133600.g007

saturated C16:0, the diet FA compositions were set to values achievable in human nutrition when expressed as % energy [42].

We first investigated the effect of the three dietary caprylic acid levels on the stomach C8:0 availability to further correlate them with the plasma acylated ghrelin concentrations. C8:0 was not detected in the liver or in the plasma (Table 3) after an 18h fast, confirming that it had been rapidly taken up and catabolized by the liver [43], even in rats fed during 6 weeks with high amounts of caprylic acid. Additionally, only a very low storage of this FA was shown in different adipose tissues even with the higher C8:0 dietary level (Table 3), which is also consistent with the described portal vein transport of MCFAs as free fatty acids [7]. Finally, dietary C8:0 increased the C8:0 level in the stomach tissue more than in all other tissues (Table 3). Moreover, the C8:0 amount was 2- to 3-fold higher in the fundus than in the corpus of both MF-8 and -21 groups (Fig 1). These results are therefore consistent with an early preduodenal hydrolysis of tricaprylin and direct absorption of C8:0 at the gastric level, starting in the first part of the stomach. The digestion of dietary fat is a complex and dynamic process which starts in the upper gastrointestinal tract under the action of preduodenal lipase (gastric lipase in humans or its homologous lingual lipase in rats) and is completed in the small intestine by pancreatic lipase. Although the existence and functional importance of a preduodenal lipase was disputed in the past [4], it is now described as contributing to 15–20% of the whole lipolysis process [44]. This preduodenal lipase may play two important roles in triggering the action of pancreatic lipase [45] and driving the early release of short and medium chain FAs that can therefore be directly absorbed in the stomach [5], which is consistent with our results (Table 3). The amounts of MCFAs absorbed by the gastric mucosa, the mechanism of this absorption [46] and the metabolic fate of C8:0 which could be used to acylate proghrelin are still unknown. Since the maximum C8:0 stomach content of the rats fed with the highest enriched diet only reached 1.2% of the total FAs (Table 3), our results suggested either that this absorption was limited or that the absorbed gastric caprylic acid was rapidly catabolized. Interestingly, in the control group receiving no C8:0, a very low but detectable amount of C8:0 (0.07% of FAs) was found in the stomach (Table 3). This suggests a possible endogenous synthesis which has been described for instance in rat liver for C14:0 but not yet for C8:0 [47]. Thus, the present work demonstrates that dietary C8:0 provided the stomach cells (especially the fundus cells) with caprylic acid.

The next issue was to determine if this higher available stomach C8:0 level influenced the stomach total ghrelin expression and increased the concentration of circulating acylated ghrelin, after the action of the gastric GOAT enzyme. Indeed, Nishi et al. detected heptanoylghrelin [25] or decanoylghrelin [48] in the stomachs of mice fed with triheptanoin or tricaprln. This suggests that ingested MCFAs were directly utilized for the ghrelin acylation. In ruminants, the ingestion of MCFAs during 2 weeks by lactating dairy cows also increased plasma acylated ghrelin concentrations [49]. In the present study, the stomach preproghrelin mRNA levels (Fig 4A) and the total ghrelin peptide (acylated and unacylated forms) expression, quantified by immunohistochemistry in the stomach (Fig 4B and 4C), displayed a linear decrease when dietary C8:0 increased. The plasma acylated ghrelin concentration was stable regardless the dietary C8:0 levels in fed (Fig 2A and 2B) and fasted (Fig 3A and 3B) MF rats. A similar stability was shown in fed (S1A and S1B Fig) and fasted (S3A and S3B Fig) HF rats. In contrast, a reproducible significant decrease in the plasma unacylated ghrelin concentration was shown in fed (Fig 2A and 2B) and fasted (Fig 3A and 3B) MF rats with the increase in dietary C8:0. This decrease was also shown in fed HF rats (S1A and S1B Fig), but not in fed CR rats (S2A and S2B Fig) which may be explained by the rapid food consumption of some of the CR animals (fed at 2 p.m. the day before blood collection) that made the nutritional status (fed or fasted) of the animals more random.

The decrease in unacylated ghrelin led to a reproducible increase in the acylated/total ghrelin ratio in fed and fasted MF rats (Fig 2C and 2D) and in fasted HF rats (S3C and S3D Fig). A similar although not significant increase was shown in fed HF rats (S1C and S1D Fig). As shown by these ratios, acylated ghrelin accounted for 30–60% of the total circulating ghrelin with the highest ratios in the plasma of rats fed with 21% C8:0. Although circulating acylated ghrelin was generally described as 10% of the total ghrelin in humans [50], acylated ghrelin concentration has been experimentally underestimated due to its quick degradation [51]. It seems that acylated ghrelin could actually represent around 30 to 50% of the total ghrelin in humans and in rodents [25], which would be consistent with our results.

These results may appear to be different from those obtained from previous studies showing that the ingestion by mice of free MCFAs or MCTs increased the stomach acylated ghrelin whereas the total amount of ghrelin remained unchanged [25]. However, there are still conflicting results regarding the effects of dietary lipids on ghrelin response. Initially, it was proposed that a fat-rich diet decreases plasma total ghrelin levels [52], but more recently it has been established that the suppression of ghrelin by lipids is relatively weak [53]. The maturation and secretion of stomach ghrelin is indeed a complex process regulated by different parameters such as dietary LCFAs and MCFAs and by fat sensing receptor (G protein-coupled receptor 120, free fatty acid receptor 1) [54]. The circulating ghrelin is additionally submitted to clearance and rapid de-acylation or degradation. For instance, a ghrelin deacylation enzyme (acyl-protein thioesterase-1, APT1) has recently been described, that can des-acylate ghrelin in the plasma [55]. Moreover, acylated ghrelin has been shown to form a complex with larger proteins like immunoglobulins (Ghrelin-reactive IgG) [56] that protects the acylated form from degradation. Some studies assaying total ghrelin in plasma have also reported lower levels in obese subjects, due to lower levels of unacylated ghrelin, whereas acylated ghrelin remained stable, suggesting a specific decreased degradation of acylated ghrelin in obese [56]. In humans, it has also been shown that the GOAT enzyme was present in the blood, which could modify the balance between de-acylation and re-acylation [57]. In a study on the role of the gustatory G-protein in the sensing of FAs for the octanoylation of ghrelin, ingested MCFAs increased stomach acylated ghrelin but did not change the plasma ghrelin concentration [58]. For all these reasons, the concentration of both the acylated and unacylated plasma ghrelin may not simply reflect the stomach concentration [59]. In the present study, we observed decreased unacylated

ghrelin and stable acylated ghrelin concentrations in the plasma and decreased total ghrelin in the stomach, with tricaprylin consumption. We can therefore speculate that the secretion of ghrelin from the stomach to the plasma remained unchanged with tricaprylin consumption. The stable levels of stomach GOAT mRNA (S4 Fig) in the MF animals also suggest that C8:0 had no effect on ghrelin octanoylation but the activity of the enzyme was not assessed. Interestingly, high levels of acylated ghrelin were measured in the MF-0 rats receiving no dietary C8:0. Thus, the low stomach C8:0 level observed in the MF-0 group (Table 3) could be enough to supply the octanoyl-CoA co-substrate used to acylate the proghrelin. Some studies suggested that the availability of MCFAs are rate-limiting for the acylation and activation of ghrelin [60] but our results showed stable concentrations of plasma acylated ghrelin whatever the dietary C8:0 levels and decreasing concentrations of its corresponding unacylated form.

These results raised the question of the physiological impact of the increased acylated/total ghrelin ratio resulting from stable plasma acylated ghrelin and decreased unacylated ghrelin. The acylated ghrelin is best known for its orexigenic actions in the central nervous system, involved in the regulation of food intake and thereby in weight control [61]. In the present study, we did not observe any effect of dietary C8:0 on body weight gain and food intake levels in the MF groups (Fig 5). The rats fed with the HF diets (S5B, S5D and S5F Fig) displayed the same weight gain, final body weight and cumulative energy intake than rats fed with the MF diets. Even fed ad libitum with the high fat diets, these rats have controlled their food intake at a similar level than the MF rats. This may explain why the plasma ghrelin level in HF groups was unchanged compared with MF groups. In the CR groups (S4A, S4C and S4E Fig), the same weight gain and final body weight were observed, but with a trend to decreased final body weight with MF-21 diet consumption. These results are consistent with the stable concentrations of plasma acylated ghrelin and suggest the absence of physiological effects of the increased acylated/total ghrelin ratios. Indeed an intracerebral acylated ghrelin administration increased body weight by stimulating food intake and by inhibiting energy expenditure and fat catabolism [62]. However, ghrelin-null mice did not exhibit altered food intake nor altered expression of hypothalamic neuropeptides involved in the regulation of appetite. This explains why the essentiality of endogenous ghrelin in the regulation of food intake now appears controversial [63]. In addition, when related to dietary lipids and especially dietary MCFAs, the importance of the so-called GOAT-ghrelin-GHSR-1a axis on these parameters is unclear. Nishi et al [48] found no effect on body weight and food intake after feeding mice during two weeks with diets enriched in tricaprylin or tricaprillin compared to control diets. However, feeding GOAT-null mice with MCT-enriched diets during 8 weeks resulted in significantly lower body weight compared with control mice [26]. By contrast, the use of MCT-enriched diets in the limitation of adiposity has been somewhat successful in humans [14,15,64,65] and in rats, when substituted for LCFAs in excess [11,12,66]. A systematic review of the literature concluded that MCTs had effectively a short-term reducing effect on weight gain in rats but that this effect disappeared in the long term studies [67], probably due to metabolic adaptation to this diet. In the present study, because dietary C8:0 was shown to be rapidly catabolized, the energy expenditure may have been increased. This may in turn have had an additional inverse effect on ghrelin which is a key component of the regulation of energy balance.

No effects of the dietary C8:0 levels and increasing acylated/total ghrelin ratios were neither shown on the plasma glucose and circulating lipids (S1 Table) in the MF, HF or CR groups. Acylated ghrelin was previously described as a modulator of glucose homeostasis [68], but the implication of the GOAT-ghrelin system was recently shown to be unessential for the maintenance of euglycemia during a prolonged calorie restriction [69].

Finally, since little or no effects of the increased acylated/total ghrelin ratio or decreased unacylated ghrelin were shown on the previously described physiological parameters, we

wondered if other parameters involved in the ghrelin-GOAT system regulation could be modulated. Since the acylated ghrelin has a major role to facilitate GH secretion [70], we therefore measured the liver insulin-like growth factor-1 (IGF-1) mRNA levels (Fig 7) in order to obtain an assessment of the average amount of GH being produced. The expression of IGF-1 was significantly higher in the MF-21 rats than in the control group. Because plasma acyl ghrelin was constant in our study, we could hypothesize that the increased ratio of acylated/total ghrelin may have led to the activation of IGF-1 transcription via the GH releasing activity of GHSR-1a. Several studies have shown that unacylated ghrelin may act as a competitive inhibitor of acylated ghrelin for the GHSR-1a receptor [71,72]. Therefore, the decrease in plasma unacylated ghrelin may increase the binding of stable acylated ghrelin to its receptor.

In addition, the animals consuming tricaprylin displayed an increase in the mean diameter of adipocytes in subcutaneous adipose tissue with no increase in the fat mass (Fig 6). This result can be explained either by a lower differentiation of preadipocytes into adipocytes leading to hypoplasia and/or by a hypertrophy of adipocytes. The link between MCFAs and adiposity is unclear since they decreased lipid accumulation in mouse 3T3-L1 preadipocytes [73] but not in human adipocytes [74]. In the present study, it seems difficult to relate the increase in adipocyte diameter given the low presence of C8:0 in adipose tissue. Concerning now the effects of acylated and/or unacylated ghrelin on adipogenesis, bibliographic data are also conflicting [75]. The action of ghrelin on adipogenesis may first be independent on its binding with the Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a (GHSR-1a), as demonstrated in several studies [76,77], and we can hypothesize in the present study that the decrease in plasma total ghrelin with tricaprylin consumption led to a decreased differentiation of preadipocytes or increased hypertrophy of adipocytes. The action of ghrelin on adipogenesis could secondly be dependent on the GHSR-1a, and we can then hypothesize that the increased plasma acylated/total ghrelin ratio with C8:0 consumption decreased the differentiation of adipocytes.

To conclude, daily feeding with dietary C8:0 increased the C8:0 level in the stomach cells more than all the other tissues and affected the plasma acylated/total ghrelin ratio by decreasing the concentration of unacylated ghrelin. This increased ratio was however not associated with increased body weight or dysregulation of food consumption, which were previously associated with the ghrelin-GOAT-GHSR-1a axis. In western countries, total dietary MCFAs represent less than 2% of total dietary energy including 1 to 2% of caprylic acid in milk fat. In terms of dietary recommendations, these results do not give any argument to limit the current consumption of foods containing caprylic acid [78]. Further studies are however needed to clarify the dose effect of caprylic acid on adipocyte differentiation.

Supporting Information

S1 Fig. Effect of tricaprylin on acylated and unacylated ghrelin concentrations in HF groups (fed state). (a) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 3 weeks of diet. Kruskal-Wallis test (K-W): (i) acylated ghrelin, $P = 0.201$; (ii) unacylated ghrelin, $P = 0.04$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$; (iii) total ghrelin, $P = 0.033$, Dunn's post tests, $^{\$}P < 0.05$. (b) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 5 weeks of diet. K-W test: (i) acylated ghrelin, $P = 0.304$; (ii) unacylated ghrelin, $P = 0.023$; Dunn's post tests, $*P < 0.05$; (iii) total ghrelin, $P = 0.2938$. (c) Acylated/total ghrelin ratios after 3 weeks of diet. K-W test: $P = 0.0669$. (d) Acylated/total ghrelin ratios after 5 weeks of diet. K-W test: $P = 0.0653$. (TIF)

S2 Fig. Effect of tricaprylin on acylated and unacylated ghrelin concentrations in CR groups (fed state). (a) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 3 weeks; Kruskal-Wallis test (K-W): (i) acylated ghrelin, $P = 0.0714$; (ii) unacylated ghrelin, $P = 0.1321$; (iii) total

ghrelin, $P = 0.1321$. (b) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 5 weeks; K-W test: (i) acylated ghrelin, $P = 0.9929$; (ii) unacylated ghrelin, $P = 0.6286$; (iii) total ghrelin, $P = 0.9929$. (c) Acylated/total ghrelin ratios after 3 weeks; K-W test, $P = 0.0250$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$. (d) Acylated/total ghrelin ratios after 5 weeks; K-W test, $P = 0.2071$. (TIF)

S3 Fig. Effect of tricaprylin on acylated and unacylated ghrelin concentrations in HF groups (fasted state). (a) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 2 weeks; Kruskal-Wallis test (K-W): (i) acylated ghrelin, $P = 0.0958$; (ii) unacylated ghrelin, $P = 0.5380$; (iii) total ghrelin, $P = 0.3532$. (b) Acylated and unacylated ghrelin concentrations after 4 weeks; K-W test: (i) acylated ghrelin, $P = 0.6808$; (ii) unacylated ghrelin, $P = 0.8580$; (iii) total ghrelin, $P = 0.9826$. (c) Acylated/total ghrelin ratios after 2 weeks; K-W test, $P = 0.0076$, Dunn's post tests, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. (d) Acylated/total ghrelin ratios after 4 weeks, K-W test, $P = 0.2248$. (TIF)

S4 Fig. Effect of C8:0 in the MF groups on stomach GOAT (MBOAT4) expression. GOAT mRNA level (in fold change). K-W test, $P > 0.05$. Results are expressed as mean \pm SEM. (TIF)

S5 Fig. Effect of tricaprylin on body weight gain and food intake in CR groups (70% of *ad libitum*) and HF groups. (a) Body weight gain (in gram) in CR groups. Two-way repeated measurement ANOVA: effect of the diet, $P = 0.0662$. (b) Body weight gain (in gram) in HF diets. Two-way repeated measurement ANOVA: effect of the diet, $P = 0.5743$. (c) Final Body weight (in gram) after 6 weeks on CR diets. Kruskal-Wallis test (K-W): $P = 0.0714$. (d) Final Body weight (g) after 6 weeks on HF diets. K-W test: $P = 0.5097$ (e) Cumulative energy intake after 6 weeks of CR diets (in Kcal); SEM is equal to zero because the rats ate their whole daily food ration; (f) Cumulative energy intake after 6 weeks on HF diets (in Kcal). K-W test: $P = 0.9286$ Results expressed as mean \pm SEM. (TIF)

S6 Fig. Effect of tricaprylin on body fat percentage in MF, CR and HF groups. Masses of mesenteric, epididymal, subcutaneous and retroperitoneal relate to total body weight. K-W test: MF groups, $P = 0.9384$; HF groups, $P = 0.6737$; CR groups, $P = 0.096$. (TIF)

S1 Table. Effect of the diets in the MF groups on the C16:0 availability in different tissues. Results expressed as mean \pm SEM. (TIF)

S2 Table. Effect of tricaprylin on triglyceridemia, cholesterolemia and glycemia in MF, CR and HF groups. Results expressed as mean \pm SEM. (TIF)

Acknowledgments

The authors thank N. Boulier-Monthéan and Dr. D. Catheline for their technical assistance, F. Boissel for animal cares and lipid extractions, X. Blanc (UPAE, INRA, Jouy-en-Josas, France) for the preparation of the diets, Dr. C. Bourlieu for the analysis of plasma free fatty acids and Dr. A. Fautrel (H2P2, Fédération de Recherche, Biosit, University of Rennes 1) for the morphometric analysis and the immunohistochemistry.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FL EB PL VR. Performed the experiments: FL SD CD. Analyzed the data: FL SD EB VR. Contributed reagents/materials/analysis tools: FL SD CD. Wrote the paper: FL VR PL.

References

1. Jensen RG, Ferris AM, Lammi-Keefe CJ, Henderson RA. Lipids of bovine and human milks: a comparison. *J Dairy Sci.* 1990; 73: 223–40. PMID: [2184172](#)
2. Takeuchi H, Sekine S, Kojima K, Aoyama T. The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2008; 17 Suppl 1: 320–323. PMID: [18296368](#)
3. Bach AC, Babayan VK. Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr.* 1982; 36: 950–62. PMID: [6814231](#)
4. Clark SB, Brause B, Holt PR. Lipolysis and Absorption of Fat in the Rat Stomach. *Gastroenterology.* 1969; 56: 214–222. doi: [10.1016/S0016-5085\(69\)80120-4](#) PMID: [5764591](#)
5. Perret JP. [Gastric lipolysis of maternal milk triglycerides, and gastric absorption of medium chain fatty acids in the young rabbit (author's transl)]. *J Physiol (Paris).* 1980; 76: 159–166.
6. Lai HC, Ney DM. Gastric digestion modifies absorption of butterfat into lymph chylomicrons in rats. *J Nutr.* 1998; 128: 2403–2410. PMID: [9868188](#)
7. You YQ, Ling PR, Qu JZ, Bistran BR. Effects of medium-chain triglycerides, long-chain triglycerides, or 2-monododecanoin on fatty acid composition in the portal vein, intestinal lymph, and systemic circulation in rats. *JPEN J Parenter Enter Nutr.* 2008; 32: 169–75.
8. Ooyama K, Kojima K, Aoyama T, Takeuchi H. Decrease of food intake in rats after ingestion of medium-chain triacylglycerol. *J Nutr Sci Vitaminol Tokyo.* 2009; 55: 423–7. PMID: [19926929](#)
9. Papamandjaris AA, MacDougall DE, Jones PJ. Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications. *Life Sci.* 1998; 62: 1203–15. PMID: [9570335](#)
10. Bach AC, Ingenbleek Y, Frey A. The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *J Lipid Res.* 1996; 37: 708–26. PMID: [8732772](#)
11. Geliebter A, Torbay N, Bracco EF, Hashim SA, Van Itallie TB. Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat. *Am J Clin Nutr.* 1983; 37: 1–4. PMID: [6849272](#)
12. Baba N, Bracco EF, Hashim SA. Role of brown adipose tissue in thermogenesis induced by overfeeding a diet containing medium chain triglyceride. *Lipids.* 1987; 22: 442–4. PMID: [3613876](#)
13. Han J, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obes Res.* 2003; 11: 734–44. PMID: [12805394](#)
14. Tsuji H, Kasai M, Takeuchi H, Nakamura M, Okazaki M, Kondo K. Dietary medium-chain triacylglycerols suppress accumulation of body fat in a double-blind, controlled trial in healthy men and women. *J Nutr.* 2001; 131: 2853–9. PMID: [11694608](#)
15. St-Onge MP, Bosarge A, Goree LL, Darnell B. Medium chain triglyceride oil consumption as part of a weight loss diet does not lead to an adverse metabolic profile when compared to olive oil. *J Am Coll Nutr.* 2008; 27: 547–52. PMID: [18845704](#)
16. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Ascherio A, Colditz GA, Speizer FE, et al. Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70: 1001–8. PMID: [10584044](#)
17. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999; 402: 656–60. PMID: [10604470](#)
18. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 279: 909–913. doi: [10.1006/bbrc.2000.4039](#) PMID: [11162448](#)
19. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberato PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science.* 1996; 273: 974–7. PMID: [8688086](#)
20. Wang Q, Liu C, Uchida A, Chuang J-C, Walker A, Liu T, et al. Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. *Mol Metab.* 2014; 3: 64–72. doi: [10.1016/j.molmet.2013.10.001](#) PMID: [24567905](#)
21. Delporte C. Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica.* 2013; 2013: 518909. doi: [10.1155/2013/518909](#) PMID: [24381790](#)

22. Zhao T-J, Liang G, Li RL, Xie X, Sleeman MW, Murphy AJ, et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2010; 107: 7467–7472. doi: [10.1073/pnas.1002271107](https://doi.org/10.1073/pnas.1002271107) PMID: [20231469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20231469/)
23. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U A*. 2008; 105: 6320–5.
24. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 2008; 132: 387–96. doi: [10.1016/j.cell.2008.01.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.017) PMID: [18267071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18267071/)
25. Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, et al. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology*. 2005; 146: 2255–64. PMID: [15677766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15677766/)
26. Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA, et al. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med*. 2009; 15: 741–5. doi: [10.1038/nm.1997](https://doi.org/10.1038/nm.1997) PMID: [19503064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19503064/)
27. Barnett BP, Hwang Y, Taylor MS, Kirchner H, Pfluger PT, Bernard V, et al. Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science*. 2010; 330: 1689–92. doi: [10.1126/science.1196154](https://doi.org/10.1126/science.1196154) PMID: [21097901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21097901/)
28. Hosoda H, Kangawa K. Standard sample collections for blood ghrelin measurements. *Methods Enzymol*. 2012; 514: 113–126. doi: [10.1016/B978-0-12-381272-8.00008-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381272-8.00008-8) PMID: [22975050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22975050/)
29. Chen C-Y, Lee W-J, Chong K, Lee S-D, Liao Y-D. Impact of intracerebroventricular obestatin on plasma acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 levels, and on gastric emptying in rats. *Mol Med Rep*. 2012; 6: 191–196. doi: [10.3892/mmr.2012.901](https://doi.org/10.3892/mmr.2012.901) PMID: [22562076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22562076/)
30. Legrand P, Beauchamp E, Catheline D, Pedrono F, Rioux V. Short Chain Saturated Fatty Acids Decrease Circulating Cholesterol and Increase Tissue PUFA Content in the Rat. *Lipids*. 2010; 45: 975–86. doi: [10.1007/s11745-010-3481-5](https://doi.org/10.1007/s11745-010-3481-5) PMID: [20924709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20924709/)
31. Guillou H, Martin P, Jan S, D'Andrea S, Roulet A, Catheline D, et al. Comparative effect of fenofibrate on hepatic desaturases in wild-type and peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice. *Lipids*. 2002; 37: 981–9. PMID: [12530558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12530558/)
32. Rioux V, Catheline D, Bouriel M, Legrand P. Dietary myristic acid at physiologically relevant levels increases the tissue content of C20:5 n-3 and C20:3 n-6 in the rat. *Reprod Nutr Dev*. 2005; 45: 599–612. PMID: [16188210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16188210/)
33. Ezanno H, Beauchamp E, Catheline D, Legrand P, Rioux V. Beneficial impact of a mix of dairy fat with rapeseed oil on n-6 and n-3 PUFA metabolism in the rat: A small enrichment in dietary alpha-linolenic acid greatly increases its conversion to DHA in the liver: Better conversion of dietary ALA to DHA when mixed with butterfat. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2015; 117:281–290 doi: [10.1002/ejlt.201400304](https://doi.org/10.1002/ejlt.201400304)
34. Rioux V, Pedrono F, Blanchard H, Duby C, Boulier-Monthean N, Bernard L, et al. Trans-vaccenate is Delta13-desaturated by FADS3 in rodents. *J Lipid Res*. 2013; 54: 3438–52. doi: [10.1194/jlr.M042572](https://doi.org/10.1194/jlr.M042572) PMID: [24070791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24070791/)
35. Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, et al. Inhibition of RXR and PPARγ ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1001–1013. PMID: [11581301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11581301/)
36. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, et al. PPARγ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. 1999; 4: 597–609. PMID: [10549291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10549291/)
37. Knockaert L, Berson A, Ribault C, Prost P-E, Fautrel A, Pajaud J, et al. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. *Lab Invest*. 2011; 92: 396–410. doi: [10.1038/labinvest.2011.193](https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.193) PMID: [22157718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22157718/)
38. Castaneda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol*. 2010; 31: 44–60. doi: [10.1016/j.yfrne.2009.10.008](https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.10.008) PMID: [19896496](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19896496/)
39. Chia DJ. Mechanisms of growth hormone-mediated gene regulation. *Mol Endocrinol*. 2014; Available: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/me.2014-1099>.
40. Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG. Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab*. 2006; 3: 379–386. PMID: [16679295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16679295/)
41. Leidy HJ, Dougherty KA, Frye BR, Duke KM, Williams NI. Twenty-four-hour Ghrelin Is Elevated after Calorie Restriction and Exercise Training in Non-obese Women. *Obesity*. 2007; 15: 446–455. doi: [10.1038/oby.2007.542](https://doi.org/10.1038/oby.2007.542) PMID: [17299118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17299118/)
42. Legrand P, Morise A, Kalonji E. Update of French nutritional recommendations for fatty acids. *World Rev Nutr Diet*. 2011; 102: 137–43. doi: [10.1159/000327800](https://doi.org/10.1159/000327800) PMID: [21865827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21865827/)

43. Zammit VA. Mechanisms of regulation of the partition of fatty acids between oxidation and esterification in the liver. *Prog Lipid Res.* 1984; 23: 39–67. PMID: [6152703](#)
44. Carriere F, Barrowman JA, Verger R, Laugier R. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology.* 1993; 105: 876–888. PMID: [8359655](#)
45. Gargouri Y, Pieroni G, Rivière C, Lowe PA, Saunière JF, Sarda L, et al. Importance of human gastric lipase for intestinal lipolysis: an in vitro study. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 879: 419–423. PMID: [3778930](#)
46. Egelrud T, Ollvecrona T, Helander H. Studies on gastric absorption of lipids in the suckling rat. *Scand J Gastroenterol.* 1971; 6: 329–333. PMID: [5561179](#)
47. Rioux V, Catheline D, Legrand P. In rat hepatocytes, myristic acid occurs through lipogenesis, palmitic shortening and lauric acid elongation. *Animal.* 2007; 1: 820–826. doi: [10.1017/S1751731107000122](#) PMID: [22444745](#)
48. Nishi Y, Mifune H, Yabuki A, Tajiri Y, Hirata R, Tanaka E, et al. Changes in Subcellular Distribution of n-Octanoyl or n-Decanoyl Ghrelin in Ghrelin-Producing Cells. *Front Endocrinol.* 2013; 4: 84. doi: [10.3389/fendo.2013.00084](#)
49. Fukumori R, Sugino T, Shingu H, Moriya N, Kobayashi H, Hasegawa Y, et al. Ingestion of medium chain fatty acids by lactating dairy cows increases concentrations of plasma ghrelin. *Domest Anim Endocrinol.* 2013; 45: 216–223. doi: [10.1016/j.domaniend.2013.09.005](#) PMID: [24209506](#)
50. Patterson M, Murphy KG, le Roux CW, Ghatei MA, Bloom SR. Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 2205–2211. doi: [10.1210/jc.2004-1641](#) PMID: [15657369](#)
51. Delhanty PJD, Huisman M, Julien M, Mouchain K, Brune P, Themmen APN, et al. The acylated (AG) to unacylated (UAG) ghrelin ratio in esterase inhibitor-treated blood is higher than previously described. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2015; 82: 142–146. doi: [10.1111/cen.12489](#)
52. Lee H-M, Wang G, Englander EW, Kojima M, Greeley GH Jr. Ghrelin, a new gastrointestinal endocrine peptide that stimulates insulin secretion: enteric distribution, ontogeny, influence of endocrine, and dietary manipulations. *Endocrinology.* 2002; 143: 185–190. PMID: [11751608](#)
53. Cummings DE, Foster-Schubert KE, Overduin J. Ghrelin and Energy Balance: Focus on Current Controversies. *Curr Drug Targets.* 2005; 6: 153–169. doi: [10.2174/1389450053174569](#) PMID: [15777186](#)
54. Gong Z, Yoshimura M, Aizawa S, Kurotani R, Zigman JM, Sakai T, et al. G protein-coupled receptor 120 signaling regulates ghrelin secretion in vivo and in vitro. *Am J Physiol—Endocrinol Metab.* 2014; 306: E28–E35. doi: [10.1152/ajpendo.00306.2013](#) PMID: [24222669](#)
55. Chen W, Enriori PJ. Ghrelin: a journey from GH secretagogue to regulator of metabolism. *Transl Gastrointest Cancer.* 2014; 4: 14–27.
56. Takagi K, Legrand R, Asakawa A, Amitani H, François M, Tennaoune N, et al. Anti-ghrelin immunoglobulins modulate ghrelin stability and its orexigenic effect in obese mice and humans. *Nat Commun.* 2013; 4. doi: [10.1038/ncomms3685](#)
57. Goebel-Stengel M, Hofmann T, Elbelt U, Teuffel P, Ahnis A, Kobelt P, et al. The ghrelin activating enzyme ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) is present in human plasma and expressed dependent on body mass index. *Peptides.* 2013; 43: 13–19. doi: [10.1016/j.peptides.2013.02.011](#) PMID: [23454172](#)
58. Janssen S, Laermans J, Iwakura H, Tack J, Depoortere I. Sensing of Fatty Acids for Octanoylation of Ghrelin Involves a Gustatory G-Protein. *PLoS ONE.* 2012; 7: e40168. doi: [10.1371/journal.pone.0040168](#) PMID: [22768248](#)
59. Nishi Y, Hiejima H, Mifune H, Sato T, Kangawa K, Kojima M. Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach. *Endocrinology.* 2005; 146: 2709–2715. doi: [10.1210/en.2004-0645](#) PMID: [15746259](#)
60. Nishi Y, Mifune H, Kojima M. Ghrelin acylation by ingestion of medium-chain fatty acids. *Methods Enzymol.* 2012; 514: 303–315. doi: [10.1016/B978-0-12-381272-8.00019-2](#) PMID: [22975061](#)
61. Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes.* 2001; 50: 2438–2443. PMID: [11679419](#)
62. Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* 2000; 407: 908–913. doi: [10.1038/35038090](#) PMID: [11057670](#)
63. Albarran-Zeckler RG, Sun Y, Smith RG. Physiological roles revealed by ghrelin and ghrelin receptor deficient mice. *Peptides.* 2011; 32: 2229–2235. doi: [10.1016/j.peptides.2011.07.003](#) PMID: [21781995](#)
64. St-Onge MP, Jones PJ. Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *J Nutr.* 2002; 132: 329–32. PMID: [11880549](#)

65. Nagao K, Yanagita T. Medium-chain fatty acids: functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc.* 2010; 61: 208–212. doi: [10.1016/j.phrs.2009.11.007](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.11.007)
66. Crozier G, Bois-Joyeux B, Chanez M, Girard J, Peret J. Metabolic effects induced by long-term feeding of medium-chain triglycerides in the rat. *Metabolism.* 1987; 36: 807–814. PMID: [3298941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3298941/)
67. Ferreira L, Lisenko K, Barros B, Zangeronimo M, Pereira L, Sousa R. Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: a systematic review. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2014; 98: 1–8. doi: [10.1111/jpn.12030](https://doi.org/10.1111/jpn.12030)
68. Briggs DI, Andrews ZB. A recent update on the role of ghrelin in glucose homeostasis. *Curr Diabetes Rev.* 2011; 7: 201–207. PMID: [21539509](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21539509/)
69. Yi C-X, Heppner KM, Kirchner H, Tong J, Bielohuby M, Gaylann BD, et al. The GOAT-ghrelin system is not essential for hypoglycemia prevention during prolonged calorie restriction. *PLoS One.* 2012; 7: e32100. doi: [10.1371/journal.pone.0032100](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032100) PMID: [22363801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22363801/)
70. Zhang Y, Fang F, Goldstein JL, Brown MS, Zhao T-J. Reduced autophagy in livers of fasted, fat-depleted, ghrelin-deficient mice: reversal by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112: 1226–1231. doi: [10.1073/pnas.1423643112](https://doi.org/10.1073/pnas.1423643112) PMID: [25583513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25583513/)
71. Kumar R, Salehi A, Rehfeld JF, Höglund P, Lindström E, Håkanson R. Proghrelin peptides: Desacyl ghrelin is a powerful inhibitor of acylated ghrelin, likely to impair physiological effects of acyl ghrelin but not of obestatin A study of pancreatic polypeptide secretion from mouse islets. *Regul Pept.* 2010; 164: 65–70. doi: [10.1016/j.regpep.2010.06.005](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.06.005) PMID: [20619300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20619300/)
72. Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, et al. Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides.* 2008; 29: 2159–2168. doi: [10.1016/j.peptides.2008.09.014](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.09.014) PMID: [18938204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18938204/)
73. Han J, Farmer SR, Kirkland JL, Corkey BE, Yoon R, Pirtskhalava T, et al. Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr.* 2002; 132: 904–10. PMID: [11983812](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11983812/)
74. Sarda P, Lepage G, Roy CC, Chessex P. Storage of medium-chain triglycerides in adipose tissue of orally fed infants. *Am J Clin Nutr.* 1987; 45: 399–405. PMID: [3812339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3812339/)
75. Bays HE, González-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008; 6: 343–368. doi: [10.1586/14779072.6.3.343](https://doi.org/10.1586/14779072.6.3.343) PMID: [18327995](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18327995/)
76. Thompson NM, Gill DAS, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson ICAF, et al. Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology.* 2004; 145: 234–242. doi: [10.1210/en.2003-0899](https://doi.org/10.1210/en.2003-0899) PMID: [14551228](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14551228/)
77. Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, et al. Des-Acyl Ghrelin Induces Food Intake by a Mechanism Independent of the Growth Hormone Secretagogue Receptor. *Endocrinology.* 2006; 147: 2306–2314. doi: [10.1210/en.2005-1357](https://doi.org/10.1210/en.2005-1357) PMID: [16484324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16484324/)
78. Astrup A, Dyerberg J, Elwood P, Hermansen K, Hu FB, Jakobsen MU, et al. The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *Am J Clin Nutr.* 2011; 93: 684–8. doi: [10.3945/ajcn.110.004622](https://doi.org/10.3945/ajcn.110.004622) PMID: [21270379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21270379/)

Annexes 2 et 3

ISSN 0985-0562

NUTRITION CLINIQUE et MÉTABOLISME

Février 2013
Vol. 27 – N° 1
p. 1–64

JOURNAL DE LA SOCIÉTÉ FRANCOPHONE
NUTRITION CLINIQUE ET MÉTABOLISME



SFNEP
Société Francophone
Nutrition Clinique et Métabolisme

**COUVERTURE REPERTOIRE DE LA
IMPACT FACTOR
0.293
NUTRITION CLINIQUE ET MÉTABOLISME**



VIE DE LA SFNEP

La lettre du Président : Lyon 2012, un nouveau cap franchi par les Journées francophones de nutrition
N. Cano 1

Prochains congrès et réunions 3

REVUES GÉNÉRALES

Impact de l'utilisation systématique d'un arbre décisionnel pour la nutrition entérale en réanimation
M. De Ryckere, Y. Maesens, J.-L. Vincent et J.-C. Preiser 5

L'acylation des protéines : une fonction cellulaire importante des acides gras saturés
H. Ezanno, E. Beauschamp, F. Lemaire, P. Logrand et V. Rioux 10

Dépister la dénutrition de l'enfant en pratique courante
R. Hankard, V. Colomb, H. Piloquet, A. Bocquet, J.-L. Bresson, A. Briand, J.-P. Chouraqui, D. Darmaun, C. Dupont, M.-L. Frelut, J.-P. Girardet, O. Guélet, D. Rieu, U. Simeoni, D. Turck et M. Vidalmet 20

L'albuminémie est-elle un marqueur de l'état nutritionnel ?
C. Aussel et L. Dymober 28

ÉVALUATION DES PRATIQUES PROFESSIONNELLES EN NUTRITION CLINIQUE

Référentiel de pratiques professionnelles : prise en charge nutritionnelle postopératoire
P. Bachmann, G. Romero, C. Bouteloup, E. Gueux, A. Petit, D. Quillot, R. Thibault, G. Zezasdrin et C. Paugam-Burtz 34

PRATIQUES EN NUTRITION

À qui et comment prescrire des compléments nutritionnels oraux à l'hôpital et à domicile ?
A. Pradignac, C. Kazma et J. Ilc 43

UNE QUESTION, UNE FICHE

Conduite à tenir lors d'une diarrhée sous nutrition entérale
S. Gref, C. Pichard et R. Thibault 51

À PROPOS D'UN CAS : TESTEZ VOS CONNAISSANCES

Prise en charge nutritionnelle après gastrectomie totale
G. Zezasdrin, R. Thibault, P. Bachmann, C. Bouteloup, E. Gueux, A. Petit et D. Quillot 56

ERRATUM

Erratum à « Prévention et traitement de la thrombose sur cathéter central en nutrition parentérale » [NuTr Clin Metab 26 (3) (2012) 135–137]
A. Van Gossum, A. Ballarin et M. Arvanitakis 62

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



ELSEVIER
MASSON

Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

NUTRITION CLINIQUE
et **MÉTABOLISME**

Nutrition clinique et métabolisme 27 (2013) 10–19

Revue générale

L'acylation des protéines : une fonction cellulaire importante des acides gras saturés

Fatty acid acylation of proteins: Emerging cellular functions for saturated fatty acids

Hélène Ezanno, Erwan Beauchamp, Fanny Lemarié, Philippe Legrand, Vincent Rioux*

Laboratoire de biochimie-nutrition humaine, agrocampus Ouest-Inra USC 2012, 65, rue de Saint-Brieuc, CS 84215, 35042 Rennes cedex, France

Reçu le 19 septembre 2012 ; accepté le 13 novembre 2012

Disponible sur Internet le 14 janvier 2013

Résumé

L'acylation d'une protéine correspond à la formation co- ou post-traductionnelle d'une liaison covalente entre un acide gras activé en acyl-CoA et un résidu d'acide aminé de la protéine substrat. Les acides gras utilisés par la cellule pour acyler des protéines sont très majoritairement saturés. On parle alors, respectivement, de palmitoylation (*S*-acylation) lorsqu'une liaison thioester se forme entre l'acide palmitique (C16:0) et la chaîne latérale d'une cystéine, de myristoylation N-terminale lorsqu'une liaison amide intervient entre l'acide myristique et la fonction amine d'une glycine N-terminale, et d'octanoylation (*O*-acylation) lorsqu'une liaison ester apparaît entre l'acide caprylique (ou octanoïque, C8:0) et la chaîne latérale d'une sérine. L'acylation concerne de très nombreuses protéines (enzymes, récepteurs, oncogènes, suppresseurs de tumeur, protéines impliquées dans la transduction des signaux, protéines de structure eucaryotes et même virales) et exerce une grande variété de fonctions dans les régulations cellulaires, puisque la liaison covalente d'un acide gras à une protéine change son hydrophobicité et permet de réguler l'ancrage de la protéine à la membrane, de modifier son adressage subcellulaire ou encore d'induire des interactions entre sous-unités protéiques. La découverte progressive de nombreuses protéines acylées, dont la fonction est régulée par l'acylation, donne donc un nouvel intérêt fonctionnel à ces acides gras saturés. L'objectif de cette revue est de synthétiser les découvertes récentes sur les différentes classes d'acylation des protéines et sur les fonctions cellulaires émergentes que cette acylation procure à certains acides gras saturés. Le lien entre ces mécanismes moléculaires et les apports alimentaires en acides gras saturés est finalement discuté.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Acides gras saturés ; Myristoylation N-terminale ; Octanoylation ; Palmitoylation ; Protéines acylées

Abstract

Fatty acid acylation of proteins corresponds to the co- or post-translational covalent linkage of a fatty acid, activated in the form of acyl-CoA, to an amino acid residue of the substrate protein. The cellular fatty acids which are involved in protein acylation are mainly saturated fatty acids. Palmitoylation (*S*-acylation) corresponds to the reversible attachment of palmitic acid (C16:0) to the side chain of a cysteine residue via a thioester bond. N-terminal myristoylation refers to the covalent attachment of myristic acid (C14:0) by an amide bond to the N-terminal glycine of many eukaryotic and viral proteins. Octanoylation (*O*-acylation) typically concerns the formation of an ester bond between octanoic acid (caprylic acid, C8:0) and the side chain of a serine residue of the gut and brain peptide ghrelin. An increasing number of proteins (enzymes, receptors, oncogenes, tumor suppressors, proteins involved in signal transduction, eukaryotic and viral structural proteins) have been shown to undergo fatty acid acylation. The acyl moiety can mediate protein subcellular localization, protein–protein interaction or protein–membrane interaction. Therefore, through the covalent modification of proteins, saturated fatty acids exhibit emerging specific and important roles in modulating protein functions. This review provides an overview of the recent findings on the various classes of protein acylation leading to the biological ability of saturated fatty acids to regulate many pathways. Finally, the links between these elucidated biochemical mechanisms and the physiological roles of dietary saturated fatty acids are discussed.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Acylated proteins; N-terminal myristoylation; Octanoylation; Palmitoylation; Saturated fatty acids

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Vincent.Rioux@agrocampus-ouest.fr (V. Rioux).

1. Introduction

Les acides gras saturés sont souvent réputés sans intérêt fonctionnel, voire même néfastes pour la santé en termes de risques cardiovasculaires [1,2]. Pourtant, les fonctions cellulaires et physiologiques récemment décrites de ces acides gras gagneraient à être mieux connues [3]. Plus précisément, la plupart des conclusions négatives englobent « les acides gras saturés », sans distinguer leurs structures, leurs fonctions et leurs caractéristiques métaboliques [4]. Or, parmi les acides gras saturés, trois au moins sont concernés par une utilisation métabolique très spécifique dans la cellule, qui s'appelle l'acylation des protéines [5]. Elle consiste en la formation co- ou post-traductionnelle d'une liaison covalente entre l'acide gras activé en acyl-CoA et un résidu d'acide aminé de la chaîne polypeptidique des protéines substrats. Les acides gras saturés concernés (Fig. 1) sont, par ordre de longueur de chaîne carbonée décroissante, l'acide

palmitique (C16:0) [6], l'acide myristique (C14:0) [7] et, plus récemment découvert, l'acide caprylique ou octanoïque (C8:0) [8]. D'autres acides gras saturés comme l'acide laurique (C12:0) [9], l'acide caprique (C10:0) et l'acide caproïque (C6:0) [10] pourraient également être impliqués de façon plus exceptionnelle dans ces réactions. La liaison de l'acyl-CoA saturé avec la protéine substrat (Fig. 1) fait intervenir soit la chaîne latérale d'un résidu cystéine ou sérine interne d'une chaîne polypeptidique (S- ou O-acylations latérales), soit la fonction amine d'une glycine N-terminale (myristoylation N-terminale). La découverte progressive de nombreuses protéines acylées, dont la fonction cellulaire est modifiée par l'acylation, donne donc un nouvel intérêt fonctionnel à ces acides gras saturés. L'objectif de cette revue est de synthétiser les découvertes récentes sur les différentes classes d'acylation des protéines et sur les fonctions cellulaires émergentes que cette acylation procure à certains acides gras saturés. Le lien entre ces mécanismes moléculaires et les apports alimentaires en acides gras saturés est finalement discuté.

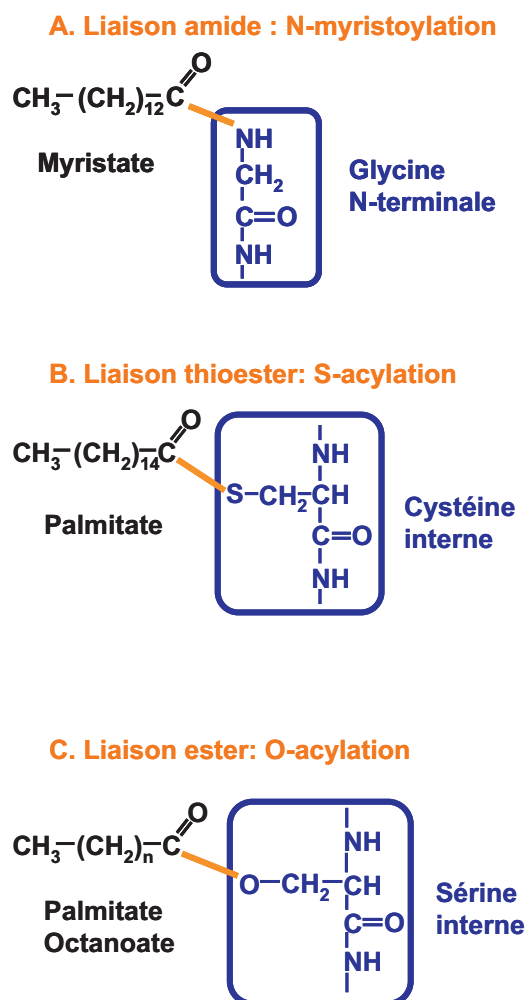


Fig. 1. Les différentes classes d'acylation des protéines par des acides gras saturés. A. La myristoylation N-terminale correspond à la formation d'une liaison amide entre l'acide myristique et la glycine N-terminale de la protéine substrat. B. La S-acylation correspond à la formation d'une liaison thioester entre l'acide palmitique et la chaîne latérale d'une cystéine interne. C. La O-acylation correspond à la formation d'une liaison ester entre un acide gras saturé (acide palmitique, acide caprylique) et la chaîne latérale d'une sérine interne.

2. L'acylation des protéines : enzymes impliquées, mécanismes et régulations

2.1. La myristoylation N-terminale et les N-myristoyltransférases (NMT)

La myristoylation N-terminale (N-acylation) consiste en la formation d'une liaison amide irréversible entre un acide myristique (C14:0), activé en myristoyl-CoA, et une protéine substrat qui doit posséder obligatoirement une glycine à son extrémité N-terminale (Fig. 1A et Tableau 1) [7]. Cette réaction est catalysée par la myristoyl-CoA : protéine N-myristoyltransférase (NMT ; EC 2.1.3.97). L'enzyme a été purifiée et clonée dans de nombreux organismes [11]. Deux gènes (*Nmt1* et *Nmt2*) codant pour deux protéines (NMT1 et NMT2) ont été identifiés chez l'homme et la souris [12], chez le rat [13], ainsi que chez certains végétaux comme *Arabidopsis thaliana* [14,15].

L'affinité de la NMT dépend de la séquence N-terminale de la protéine substrat : la présence d'une glycine N-terminale est obligatoire [16,17], mais la suite de la séquence consensus est moins bien décrite (Fig. 2). Une sérine en position 5 (qui peut parfois être remplacée par une thréonine ou une cystéine) et des résidus basiques en position 7 et 8 favorisent l'affinité de la NMT pour le substrat [18]. Bien que la définition d'une séquence consensus N-terminale de myristoylation reste approximative, plusieurs outils informatiques de prédiction ont été développés [19–21]. La NMT possède également une forte affinité pour son autre substrat, le myristoyl-CoA, en raison de la structure de son site catalytique [22]. Des études menées in vitro ont en effet montré que l'affinité de l'enzyme pour les palmitoyl-CoA et lauroyl-CoA [23], ou encore pour les acyl-CoAs saturés impairs qui encadrent l'acide myristique (C13:0 et C15:0) [24], est significativement plus faible que pour le myristoyl-CoA [25]. Seule exception à cette règle, une « hétéroacylation » qui a été décrite dans la rétine des mammifères et des amphibiens [26,27] : dans ce tissu, l'acide laurique (C12:0) et deux formes rares d'acides gras insaturés à 14 carbones (les C14:1 n-9 et C14:2 n-6) peuvent

Tableau 1
Synthèse des connaissances sur les enzymes impliquées dans l'acylation des protéines par des acides gras saturés.

Enzyme	N-myristoyltransférase (NMT)	Protéine S-acyltransférase (PAT)	Ghréline O-acyltransférase (GOAT)
Famille	GNAT (GCN5-related N-acetyltransférase)	Protéines à domaine DHHC	MBOAT (<i>membrane-bound-O-acyltransferases</i>)
Réaction catalysée	Myristoylation (N-acylation)	Palmitoylation (S-acylation)	Octanoylation (O-acylation)
Acyl-CoA substrat (majoritaire)	Myristoyl-CoA	Palmitoyl-CoA	Octanoyl-CoA
Résidu d'acide aminé du substrat protéique	Glycine N-terminale	Cystéine interne	Sérine interne
Type de liaison	Amide	Thioester	Ester
Stade du mécanisme	Co- et post-traductionnel	Post-traductionnel	Post-traductionnel
Réversibilité de la liaison	Irréversible	Réversible	Réversible
Nombre d'isoformes de l'enzyme chez l'homme	2 (NMT1 et NMT2)	Jusqu'à 24 (DHHC1 à 25)	1
Localisation subcellulaire de l'enzyme	Cytosol	Membranaire et dans de nombreux compartiments subcellulaires	Réticulum endoplasmique
Nombre de substrats protéiques	60 protéines bien décrites chez l'homme, 200 à 300 prédites	Plusieurs centaines	1 (la ghréline)

remplacer l'acide myristique comme substrat de la myristoylation, phénomène sans explication actuelle [28–30].

Initialement, la myristoylation N-terminale a été décrite comme un mécanisme cotraductionnel [31]. La glycine N-terminale de la protéine en cours de traduction est exposée à l'action de la NMT (Fig. 2A), après clivage de la méthionine initiatrice par la méthionyl-aminopeptidase [32]. Plus récemment, une myristoylation post-traductionnelle a également été mise en évidence dans des cellules en apoptose [33,34]. La glycine nécessaire à la myristoylation est dans ce cas exposée après clivage de la protéine substrat par des caspases, ce qui dévoile un site initialement caché de myristoylation (Fig. 2B). Le nombre identifié de protéines substrats de la myristoylation post-traductionnelle est en augmentation constante [35]. La

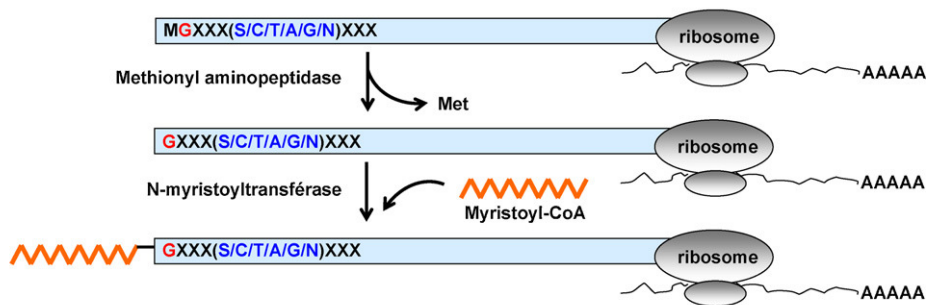
protéine pro-apoptotique Bid (famille des BCL-2) [33], l'actine [36], la PAK2 (*p21-activated kinase 2*) [37] ou encore la PKCε (*protein kinase C ε*) [38] sont des exemples de ce mécanisme post-traductionnel.

Les données disponibles sur la régulation de l'activité de la NMT sont réduites. Un mécanisme de phosphorylation de la NMT par des Src tyrosine kinases [39] a été décrit, ainsi que par les Lyn et Fyn kinases, qui sont elles-mêmes myristoylées [40].

2.2. La S-acylation des protéines et les palmitoyl S-acyltransférases (PAT)

La S-acylation correspond à la formation d'une liaison thioester post-traductionnelle réversible entre la chaîne latérale d'un

A : Myristoylation co-traductionnelle



B : Myristoylation post-traductionnelle

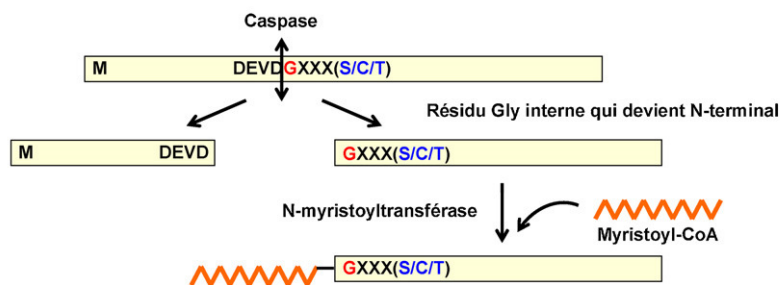


Fig. 2. Comparaison du mécanisme cotraductionnel (A) et post-traductionnel (B) de la myristoylation N-terminale. D'après [34].

résidu cystéine interne de la protéine substrat et un acide gras (Fig. 1B et Tableau 1) [41]. Du fait de son abondance dans la cellule, cet acide gras est très majoritairement l'acide palmitique (C16:0) activé en palmitoyl-CoA [42,43], d'où le terme de palmitoylation pour désigner ce type d'acylation. Cependant, d'autres acides gras, tels que les acides stéarique (C18:0) ou arachidonique (C20:4 *n*-6), ont également été identifiés sur des protéines S-acylées [44,45].

La S-acylation est catalysée par la famille récemment identifiée des palmitoylacyltransférases (PAT) qui possèdent un domaine catalytique DHHC (Asp-His-His-Cys) commun. Ce sont des enzymes membranaires qui contiennent quatre à six domaines transmembranaires [46]. Le motif DHHC, domaine en doigt de zinc, est nécessaire à l'activité acyltransférase des PAT [47]. Les PAT sont assez mal décrites et font encore l'objet de nombreuses recherches, en raison de leur difficulté à être purifiées [25]. À l'heure actuelle, 24 isoformes de PAT possédant un domaine DHHC ont été identifiées chez les mammifères, alors que la levure n'en possède que sept [46]. De nombreuses études assez récentes de co-expression ont montré que certaines PAT palmitoylent une large gamme de substrats protéiques, contrairement à d'autres qui sont très spécifiques [46]. Par exemple, les DHHC3 et 7 ont plus d'une vingtaine de substrats connus, alors que les DHHC4 et 5 semblent spécifiques d'un seul substrat [46]. Aucune séquence consensus de palmitoylation de la protéine substrat n'est clairement décrite, mais il semblerait que la présence d'une cystéine, proche d'une glycine myristoylée, ou proche de l'interface membrane-cytoplasme soit requise pour entraîner la palmitoylation [48,49].

En raison du nombre important d'isoformes de la famille DHHC, et de leur répartition dans différents compartiments subcellulaires, on suppose que la machinerie cellulaire de

palmitoylation est hautement régulée, mais les données disponibles pour confirmer cette hypothèse sont rares.

2.3. La O-acylation et la ghréline O-acyltransférase (GOAT)

La O-acylation consiste en la formation d'une liaison ester post-traductionnelle réversible entre un acide gras saturé et la chaîne latérale d'un résidu sérine de la protéine substrat (Fig. 1C et Tableau 1) [50]. Pendant longtemps, la O-acylation a été décrite comme un mécanisme autocatalytique et faisant majoritairement intervenir l'acide palmitique [51]. Récemment, l'enzyme qui catalyse la O-acylation de la ghréline (la seule hormone orexigène circulante actuellement décrite [52]) par l'acide caprylique (ou acide octanoïque, C8:0) a été identifiée [53]. Il s'agit donc du premier et unique cas d'octanoylation connu chez les mammifères [53]. L'enzyme, qui appartient à la famille des *Membrane-bound O-acyltransferase* (MBOAT), a été appelée la ghréline O-acyltransférase (GOAT ou MBOAT4) [54]. C'est une protéine membranaire de 435 acides aminés possédant huit domaines transmembranaires [53]. Deux résidus Asn-307 et His-338 présents dans le site catalytique de la GOAT semblent indispensables à l'activité de l'enzyme et sont d'ailleurs conservés parmi les autres membres de la famille des MBOAT [53,55].

Le mécanisme d'octanoylation et de maturation de la ghréline a également été récemment décrit (Fig. 3). Après avoir été traduite dans l'estomac, la pré-pro-ghréline est clivée une première fois par une peptidase signal pour donner la pro-ghréline. La pro-ghréline est ensuite acylée par un octanoyl-CoA, par une liaison ester sur la chaîne latérale du résidu Ser-3, sous l'action de la GOAT. D'après Yang et al. [53], la séquence peptidique

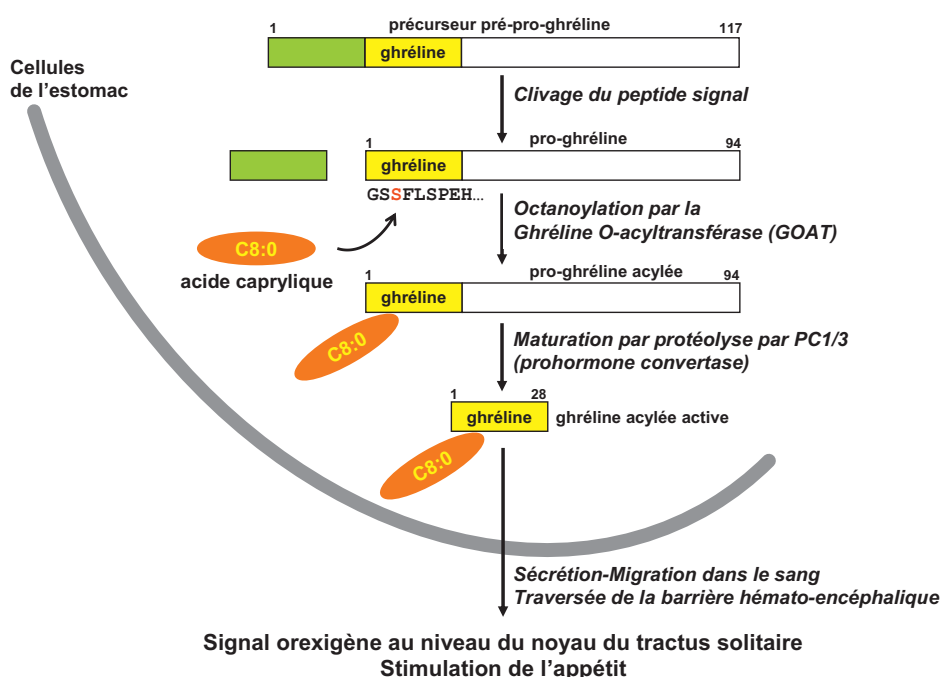


Fig. 3. Mécanisme de maturation et d'octanoylation post-traductionnelle de la ghréline. D'après [55].

Gly-Ser-Ser-Phe-Leu, qui correspond aux cinq acides aminés N-terminaux de la pro-ghréline, serait requise pour la reconnaissance du substrat par la GOAT. Ensuite, la pro-ghréline octanoylée est clivée une seconde fois par la prohormone convertase 1/3 (PC1/3), pour former la gréline active (peptide de 28 acides aminés) et acylée [55]. Après maturation, le peptide octanoylé est sécrété dans la circulation sanguine afin d'exercer son rôle hormonal.

Tout comme son substrat peptidique, la GOAT est très majoritairement synthétisée au niveau du système gastrique. Son activité semble régulée par la disponibilité en nutriments dans l'estomac et l'intestin [53], mais aussi par la disponibilité en acides gras alimentaires, par le niveau de dépense énergétique de l'organisme ainsi que par la masse adipeuse de l'individu [56].

3. Protéines acylées et conséquences fonctionnelles de l'acylation

L'acylation concerne de nombreuses protéines, telles que des enzymes, des récepteurs, des oncogènes, des suppresseurs de tumeur, des protéines impliquées dans la transduction du signal ou encore des protéines de structure eucaryotes et même virales [20,57]. Le nombre de protéines acylées identifiées augmente fortement actuellement en raison du développement des outils de prédiction bioinformatique, et des méthodologies de protéomique et de marquage cellulaire par des analogues d'acides gras tels que les alcynes [38,58]. En raison de la diversité des

types d'acylation et de la variété des substrats acylés, la difficulté est ici de rester synthétique, sans multiplier les exemples. De nombreuses études ont cependant évalué l'impact global de l'acylation sur les protéines cibles et ont démontré que la liaison covalente d'un acide gras à une protéine change son hydrophobicité et permet donc de réguler l'ancrage de la protéine à la membrane, de modifier son adressage subcellulaire ou encore d'induire des interactions entre sous-unités protéiques [25].

3.1. Protéines myristoylées et conséquences de la myristoylation

Rappelons tout d'abord que la myristoylation des protéines est nécessaire à la vie. Chez la levure, la délétion du gène unique codant pour la NMT est létale [59]. Chez la drosophile, la délétion du seul gène connu affecte profondément le développement [60]. Chez la souris, les *knock-out* NMT1 [61] ne sont pas viables (arrêt du développement embryonnaire à un stade précoce). La myristoylation est enfin nécessaire au développement de plusieurs parasites et champignons pathogènes [62]. À l'inverse, la myristoylation aberrante de la protéine SHOC2, causée par une mutation génétique d'une sérine N-terminale en glycine (qui devient myristoylée), entraîne l'adressage de cette protéine vers la membrane plasmique plutôt que vers le noyau (lieu d'activation classique de la transcription des gènes de la voie de signalisation Ras/MAP-kinase). Ce dysfonctionnement conduit à l'apparition du syndrome « Noonan-like », les sujets présentant un faciès caractéristique, une déformation du

Tableau 2

Liste non exhaustive montrant la diversité des protéines acylées.

Familles de protéines	Protéines myristoylées	Protéines palmitoylées	Protéines octanoylées
Enzymes	Protéine kinase AMPc-dépendante Calcineurine B <i>Nitric oxyde synthase</i> endothéliale (eNOS) NADH-cytochrome <i>b5</i> réductase Dihydrocéramide Δ 4-désaturase PAK2 (<i>p21-activated kinase 2</i>) et PKC ϵ (<i>protein kinase C ϵ</i>) (post-traductionnelle)	Famille des tyrosine kinases (<i>fyn</i> , <i>src</i> , <i>Lck</i> , <i>huntingtine</i>) <i>Nitric oxyde synthase</i> endothéliale (eNOS)	
Hormones peptidiques Oncogènes	Petites protéines G (famille ras)	Petites protéines G (famille ras)	Ghréline
Suppresseurs de tumeurs	Fus-1 MARCKS (<i>myristoylated alanine-rich C kinase substrate</i>)		
Signalisation	Sous-unité α des protéines G hétérotrimériques ARF (<i>ADP-ribosylation factor</i>) Bid (famille des BCL-2) (post-traductionnelle)	Sous-unité α des protéines G hétérotrimériques	
Récepteur	Récepteur à l'insuline Récepteur α 2-adrénérique	CD36 ABC transporter A1 Famille de SNAREs (<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors</i>)	
Protéines de liaison au Ca ²⁺	Recoverine Neurocalcine		
Structure	β -actine et gelsolin (post-traductionnelle) VP2 et VP4 (poliovirus)		
Capside virale	GAG (VIH)		

torse, des retards mentaux et des risques de maladies cardiaques élevés [63].

Parmi les 200 à 300 protéines potentiellement myristoylables prédites par la bioinformatique [19–21], seulement une soixantaine est connue et bien décrite chez l'homme [64]. Il s'agit de facteurs clés de la signalisation intracellulaire, tels que la sous-unité α des protéines G [65] ou la protéine MARCKS [66], des oncogènes [67] et des protéines eucaryotes communes comme la NADH-cytochrome *b5* réductase [68] ou la dihydrocéramide $\Delta 4$ -désaturase [69,70] (Tableau 2).

Un premier rôle important de la myristoylation est de faciliter l'ancrage à la membrane de la protéine myristoylée. Cependant, de nombreuses études biophysiques ont montré que la seule myristoylation n'est pas suffisante à l'ancrage stable d'un polypeptide [71]. Une double acylation (myristoylation suivie d'une palmitoylation ou précédée d'une isoprénnylation, liaison thioéther à un isoprène [72]) permet en revanche cet ancrage. C'est par exemple le cas de la protéine *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) qui est à la fois myristoylée puis palmitoylée [73]. Dans d'autres cas, c'est la présence d'un domaine polybasique qui facilite l'adressage de la protéine myristoylée à la membrane. La protéine *myristolated alanine-rich C kinase subtrat* (MARCKS) possède par exemple un domaine riche en lysines, qui interagit avec les phospholipides acides membranaires [66]. Lorsqu'elle est myristoylée et donc adressée à la membrane, MARCKS peut rencontrer la protéine kinase C (PKC) membranaire qui va catalyser la phosphorylation d'une sérine située justement dans le cœur polybasique. Cette phosphorylation entraîne une modification des interactions entre le domaine polybasique et les phospholipides membranaires et donc la libération de la protéine dans le cytosol [74]. Enfin, l'association à la membrane d'une protéine myristoylée peut être régulée par d'autres ligands comme le GTP, le phosphate ou le calcium qui modifient la structure de la protéine et entraînent la séquestration de l'acide myristique au fond d'une poche hydrophobe permettant la libération de la protéine initialement ancrée à la membrane. Ce mécanisme est appelé « myristoyl-switch » [75] et il concerne par exemple la recoverine [76], protéine de la famille des calmodulines.

Le deuxième rôle de la myristoylation est de contribuer à un adressage subcellulaire spécifique de certaines protéines. On peut par exemple citer la NADH-cytochrome *b5* réductase qui est localisée dans les microsomes mais qui, une fois myristoylée, se retrouve partiellement dans la membrane externe des mitochondries [68]. C'est également le cas de la dihydrocéramide $\Delta 4$ -désaturase, dont l'activité et la localisation subcellulaire sont régulées par la myristoylation [69,70,77].

Un troisième rôle décrit pour la myristoylation est celui de l'interaction entre sous-unités protéiques. Par exemple, la sous-unité α des protéines hétérotrimériques G, qui interviennent dans la transduction de signaux dans la cellule, est myristoylée (sur la glycine N-terminale) et palmitoylée (sur la cystéine adjacente). La sous-unité γ est quant à elle isoprénnylée, ce qui permet son adressage cellulaire. Dans ce cas, la double acylation permet l'ancrage de la sous-unité α à la membrane mais également l'interaction entre les différentes sous-unités [78].

3.2. Protéines palmitoylées et conséquences de la palmitoylation

La palmitoylation concerne plusieurs centaines de protéines, qui sont majoritairement transmembranaires (Tableau 2). Par exemple, le « palmitoylome » récemment mis en évidence dans les neurones de mammifères représente plus de 250 protéines [79]. La palmitoylation permet l'association de la protéine avec la membrane, le trafic des protéines, la fusion des vésicules, la transduction de certains signaux et affecte la stabilité protéique [3,47]. La caractéristique majeure de cette liaison est sa réversibilité, ce qui rend possible un cycle d'acylation–déacylation [80]. Ce cycle dynamique pourrait être particulièrement important pour le développement neuronal et la plasticité synaptique [81].

La palmitoylation est impliquée notamment dans le trafic des protéines oncogènes Ras entre les organites cellulaires et la membrane plasmique [82]. Les protéines H-Ras et N-Ras sont présentes chez les mammifères et appartiennent à la famille des « small GTPases », qui sont impliquées dans la traduction de signaux entraînant la division cellulaire, ce qui leur donne un intérêt potentiel dans le traitement des cancers [83]. H-Ras et N-Ras sont d'abord isoprénnylées, ce qui les oriente vers le réticulum endoplasmique. La palmitoylation permet ensuite leur adressage subcellulaire depuis la membrane du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, puis vers la membrane plasmique. Il s'agit donc d'un adressage subcellulaire dynamique permis par la réversibilité de la palmitoylation.

La palmitoylation influe également sur la stabilité des protéines situées au niveau de la face cytoplasmique membranaire. La palmitoylation permet en effet à certaines protéines d'échapper à la dégradation par le protéasome ou les lysosomes, en adressant la protéine palmitoylée dans un compartiment différent de celui contenant les enzymes d'ubiquitination ou en stabilisant l'interaction entre la bicouche lipidique et la protéine [84].

3.3. Ghréline octanoylée et conséquences de l'octanoylation

Il est important de préciser ici que seule la forme octanoylée [53] de la ghréline circulante est capable de se fixer sur le récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHS-R) au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus et d'induire la majorité des effets physiologiques décrits pour cette hormone peptidique (sécrétion d'hormone de croissance, contrôle de la prise alimentaire, régulation de la balance énergétique). Pourtant, on estime seulement à 10 à 20 % la part de ghréline acylée dans le sang [55], ce qui signifie que la forme circulante majeure est non octanoylée. Le niveau d'octanoylation de la ghréline et par suite le niveau d'activité de la GOAT semblent donc déterminants dans la signalisation induite. Chez la souris nourrie pendant huit semaines par un régime très riche en lipides (58 % de l'énergie), les mutants *knock-out* pour la GOAT (qui possèdent une concentration plasmatique supérieure en ghréline non-acylée mais pas la forme octanoylée) ont un poids légèrement mais significativement plus faible que les témoins [56]. Cette différence significative

disparaît lorsque les animaux sont nourris par un régime classique. Ces résultats ont conduit à l'hypothèse que l'inhibition de la GOAT pourrait diminuer le niveau d'octanoylation de la ghréline et diminuer également les effets orexigènes de la ghréline acylée, d'où le développement actuel de recherches sur l'inhibition de la GOAT par des peptides octanoylés [85]. L'administration intrapéritonéale de l'un de ces inhibiteurs a montré une diminution de la prise de poids et de la masse adipeuse chez la souris nourrie par un régime très riche en triglycérides à chaînes saturées moyennes [86].

4. L'origine des acides gras saturés qui acylent les protéines

Les acides gras saturés cellulaires substrats de l'acylation des protéines peuvent être synthétisés *de novo*, ou bien être apportés par l'alimentation. Cette présentation quelque peu caricaturale doit cependant être modulée en fonction de l'acide gras saturé étudié, de l'animal concerné, du tissu analysé et du type d'alimentation.

Le foie est le site principal de la biosynthèse des acides gras saturés chez l'homme. La synthèse endogène des acides gras saturés, réalisée grâce à l'acétyl-CoA carboxylase puis par le complexe multi-enzymatique acide gras synthase, conduit très majoritairement à la formation d'acide palmitique [87], en raison de la forte affinité pour cet acide gras de la thioestérase terminale liée au complexe (thioestérase I). L'acide myristique et les acides gras saturés plus courts dont l'acide caprylique peuvent cependant être produits dans la glande mammaire des mammifères grâce à la présence d'une thioestérase II cytosolique [88], qui prend en charge l'acide gras en formation à la place de la thioestérase I, et permet donc sa libération avant qu'il n'atteigne la longueur de 16 carbones.

Les principales sources alimentaires riches en acides gras saturés sont les matières grasses d'origine animale (viandes, charcuteries, lait et produits laitiers), mais également certaines huiles végétales comme l'huile de coco ou de palme [89]. Les trois acides gras saturés les plus consommés dans l'alimentation humaine sont l'acide palmitique (30 à 38 g/jour), l'acide stéarique (14 à 20 g/j) et l'acide myristique (6 à 12 g/j) [90].

Dans les tissus humains, les acides gras saturés représentent entre 30 et 40 % des acides gras totaux avec la répartition suivante : 15 à 25 % d'acide palmitique, 10 à 20 % d'acide stéarique, 0,5 à 1 % d'acide myristique et moins de 1 % pour chaque acide gras saturé à chaîne courte et moyenne (C4:0–C12:0) dont l'acide caprylique [91]. Ces acides gras sont estérifiés dans les lipides (triglycérides et phospholipides) et les données sur les concentrations cellulaires des formes acyl-CoA de ces acides gras, qui sont les substrats réels de l'acylation des protéines, sont en revanche très réduites. D'après Faergeman et Knudsen [92], la concentration intracellulaire des acyl-CoAs totaux ne dépasse pas 200 nM, et, pour chaque acyl-CoA individuel, l'ordre de grandeur est 5 nM. Les profils en acyl-CoAs, comme les profils en acides gras, sont différents entre les tissus [30].

Une question récurrente et ouverte concernant les acides gras saturés substrats des acyltransférases (NMT, PAT ou GOAT)

est donc la régulation de leur concentration intracellulaire sous forme d'acyl-CoA disponible pour acyler les protéines. Concernant l'acide palmitique, sa synthèse endogène prépondérante associée à un apport alimentaire quantitativement important rend probablement sa concentration intracellulaire non limitante pour les phénomènes d'acylation. Les protéines DHHC-PAT semblent de plus posséder une affinité supérieure pour les acyl-CoAs saturés et monoinsaturés à longues chaînes (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1) [47,93]. Concernant les acides myristique et caprylique, la situation est quelque peu différente en raison de leur biosynthèse endogène faible (quelques centaines de µg par jour dans le foie pour l'acide myristique [94]) ou même absente (hors tissu mammaire en lactation) pour l'acide caprylique. L'origine alimentaire de ces deux acides gras substrats de l'acylation semble donc quantitativement prépondérante. La NMT ne semble d'ailleurs pas faire de différence entre l'origine exogène ou endogène à la cellule de l'acide myristique, aussi bien chez la levure [32,95,96] que dans l'hépatocyte de rat en culture primaire [9,97]. On peut donc supposer qu'il existe un pool intracellulaire de myristoyl-CoA, proche du réticulum endoplasmique et disponible pour la myristoylation des protéines en cours de traduction, ce pool étant alimenté par une hydrolyse régulée de l'acide myristique estérifié dans les triglycérides et par un apport externe. Dans le processus d'octanoylation de la ghréline, l'origine alimentaire de l'acide caprylique semble admise mais non totalement démontrée. Avant la découverte de la GOAT, Nishi et al. ont montré chez la souris que les acides gras saturés à chaînes moyennes alimentaires sont directement utilisés pour l'acylation de la ghréline [98]. En utilisant un régime enrichi en triglycérides contenant de l'acide heptanoïque (C7:0), la forme acylée par le C7:0 de la ghréline a été retrouvée dans l'estomac [56]. En revanche, il n'y a pas de données sur les niveaux d'absorption gastrique de l'acide caprylique ni sur son métabolisme intermédiaire dans la cellule d'estomac.

5. Conclusion

Ces données montrent clairement que certains acides gras saturés possèdent un rôle structural et fonctionnel de toute première importance dans la cellule vivante, par leur capacité à acyler des protéines. Ainsi, un inventaire plus précis des protéines cellulaires acylées et de la régulation de leur fonction par l'acylation est nécessaire. Dans ce cadre, l'importance physiologique des acides gras saturés d'origine alimentaire doit donc être considérée [99].

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent qu'une partie des recherches du doctorat d'Hélène Ezanno a été financée par le Centre national interprofessionnel de l'économie laitière.

Références

- [1] Caggiula AW, Mustad VA. Effects of dietary fat and fatty acids on coronary artery disease risk and total and lipoprotein cholesterol concentrations: epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1597S–610S.

- [2] Nicolosi RJ. Dietary fat saturation effects on low-density-lipoprotein concentrations and metabolism in various animal models. *Am J Clin Nutr* 1997;65:1617S–27S.
- [3] Rioux V, Legrand P. Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:752–8.
- [4] Legrand P. Intérêt nutritionnel des principaux acides gras des lipides laitiers. *Sci Aliments* 2008;28:34–43.
- [5] Towler DA, Gordon JI, Adams SP, Glaser L. The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu Rev Biochem* 1988;57:69–99.
- [6] Berthiaume L, Resh MD. Biochemical characterization of a palmitoyl acyltransferase activity that palmitoylates myristoylated proteins. *J Biol Chem* 1995;270:22399–405.
- [7] Beauchamp E, Rioux V, Legrand P. Acide myristique : nouvelles fonctions de régulation et de signalisation. *Med Sci (Paris)* 2009;25:57–63.
- [8] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656–60.
- [9] Rioux V, Daval S, Guillou H, Jan S, Legrand P. Although it is rapidly metabolized in cultured rat hepatocytes, lauric acid is used for protein acylation. *Reprod Nutr Dev* 2003;43:419–30.
- [10] Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, Nakashima Y, Ida T, Sato T, et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386:153–8.
- [11] Farazi TA, Waksman G, Gordon JI. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J Biol Chem* 2001;276:39501–4.
- [12] Giang DK, Cravatt BF. A second mammalian N-myristoyltransferase. *J Biol Chem* 1998;273:6595–8.
- [13] Rioux V, Beauchamp E, Pedrono F, Daval S, Molle D, Catheline D, et al. Identification and characterization of recombinant and native rat myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferases. *Mol Cell Biochem* 2006;286:161–70.
- [14] Pierre M, Traverso JA, Boisson B, Domenichini S, Bouchez D, Giglione C, et al. N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 2007;19:2804–21.
- [15] Boisson B, Giglione C, Meinel T. Unexpected protein families including cell defense components feature in the N-myristoylome of a higher eukaryote. *J Biol Chem* 2003;278:43418–29.
- [16] Towler DA, Eubanks SR, Towery DS, Adams SP, Glaser L. Amino-terminal processing of proteins by N-myristoylation. Substrate specificity of N-myristoyl transferase. *J Biol Chem* 1987;262:1030–6.
- [17] Towler DA, Adams SP, Eubanks SR, Towery DS, Jackson-Machelski E, Glaser L, et al. Purification and characterization of yeast myristoyl CoA: protein N-myristoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:2708–12.
- [18] Utsumi T, Nakano K, Funakoshi T, Kayano Y, Nakao S, Sakurai N, et al. Vertical-scanning mutagenesis of amino acids in a model N-myristoylation motif reveals the major amino-terminal sequence requirements for protein N-myristoylation. *Eur J Biochem* 2004;271:863–74.
- [19] Bologna G, Yvon C, Duvaud S, Veuthey AL. N-Terminal myristoylation predictions by ensembles of neural networks. *Proteomics* 2004;4:1626–32.
- [20] Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Eisenhaber F. N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J Mol Biol* 2002;317:541–57.
- [21] Frotin F, Martinez A, Peynot P, Mitra S, Holz RC, Giglione C, et al. The proteomics of N-terminal methionine cleavage. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:2336–49.
- [22] Bhatnagar RS, Futterer K, Waksman G, Gordon JI. The structure of myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1999;1441:162–72.
- [23] Rudnick DA, Lu T, Jackson-Machelski E, Hernandez JC, Li Q, Gokel GW, et al. Analogs of palmitoyl-CoA that are substrates for myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10507–11.
- [24] Rudnick DA, McWherter CA, Adams SP, Ropson IJ, Duronio RJ, Gordon JI. Structural and functional studies of *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase produced in *Escherichia coli*. Evidence for an acyl-enzyme intermediate. *J Biol Chem* 1990;265:13370–8.
- [25] Resh MD. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999;1451:1–16.
- [26] Kokame K, Fukada Y, Yoshizawa T, Takao T, Shimonishi Y. Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein alpha-subunit. *Nature* 1992;359:749–52.
- [27] Neubert TA, Johnson RS, Hurley JB, Walsh KA. The rod transducin alpha subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated. *J Biol Chem* 1992;267:18274–7.
- [28] DeMar Jr JC, Wensel TG, Anderson RE. Biosynthesis of the unsaturated 14-carbon fatty acids found on the N termini of photoreceptor-specific proteins. *J Biol Chem* 1996;271:5007–16.
- [29] DeMar Jr JC, Anderson RE. Identification and quantitation of the fatty acids composing the CoA ester pool of bovine retina, heart, and liver. *J Biol Chem* 1997;272:31362–8.
- [30] Bereta G, Palczewski K. Heterogeneous N-terminal acylation of retinal proteins results from the retina's unusual lipid metabolism. *Biochemistry* 2011;50:3764–76.
- [31] Wilcox C, Hu JS, Olson EN. Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science* 1987;238:1275–8.
- [32] Gordon JI, Duronio RJ, Rudnick DA, Adams SP, Gokel GW. Protein N-myristoylation. *J Biol Chem* 1991;266:8647–50.
- [33] Zha J, Weiler S, Oh KJ, Wei MC, Korsmeyer SJ. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 2000;290:1761–5.
- [34] Martin DD, Beauchamp E, Berthiaume LG. Post-translational myristoylation: fat matters in cellular life and death. *Biochimie* 2011;93:18–31.
- [35] Martin DD, Ahpin CY, Heit RJ, Perinpanayagam MA, Yap MC, Veldhoen RA, et al. Tandem reporter assay for myristoylated proteins post-translationally (TRAMPP) identifies novel substrates for post-translational myristoylation: PKC{varepsilon}, a case study. *Faseb J* 2012;26:13–28.
- [36] Utsumi T, Sakurai N, Nakano K, Ishisaka R. C-terminal 15 kDa fragment of cytoskeletal actin is posttranslationally N-myristoylated upon caspase-mediated cleavage and targeted to mitochondria. *FEBS Lett* 2003;539:37–44.
- [37] Vilas GL, Corvi MM, Plummer GJ, Seime AM, Lambkin GR, Berthiaume LG. Posttranslational myristoylation of caspase-activated p21-activated protein kinase 2 (PAK2) potentiates late apoptotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6542–7.
- [38] Martin DD, Vilas GL, Prescher JA, Rajaiah G, Falck JR, Bertozzi CR, et al. Rapid detection, discovery, and identification of post-translationally myristoylated proteins during apoptosis using a bio-orthogonal azidomyristate analog. *Faseb J* 2008;22:797–806.
- [39] Rajala RV, Datla RS, Carlsen SA, Anderson DH, Qi Z, Wang JH, et al. Phosphorylation of human N-myristoyltransferase by N-myristoylated SRC family tyrosine kinase members. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:233–9.
- [40] Selvakumar P, Lakshmikuttyamma A, Shrivastav A, Das SB, Dimmock JR, Sharma RK. Potential role of N-myristoyltransferase in cancer. *Prog Lipid Res* 2007;46:1–36.
- [41] Resh MD. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat Chem Biol* 2006;2:584–90.
- [42] Mumby SM. Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:148–54.
- [43] McIlhinney RA. The fats of life: the importance and function of protein acylation. *Trends Biochem Sci* 1990;15:387–91.
- [44] Liang X, Nazarian A, Erdjument-Bromage H, Bornmann W, Tempst P, Resh MD. Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction. *J Biol Chem* 2001;276:30987–94.
- [45] Kordyukova LV, Serebryakova MV, Baratova LA, Veit M. S acylation of the hemagglutinin of influenza viruses: mass spectrometry reveals site-specific attachment of stearic acid to a transmembrane cysteine. *J Virol* 2008;82:9288–92.

- [46] Greaves J, Chamberlain LH. DHHC palmitoyl transferases: substrate interactions and (patho)physiology. *Trends Biochem Sci* 2011;36:245–53.
- [47] Mitchell DA, Vasudevan A, Linder ME, Deschenes RJ. Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases. *J Lipid Res* 2006;47:1118–27.
- [48] Linder ME, Deschenes RJ. New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* 2003;42:4311–20.
- [49] Bijlmakers MJ, Marsh M. The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol* 2003;13:32–42.
- [50] Grand RJ. Acylation of viral and eukaryotic proteins. *Biochem J* 1989;258:625–38.
- [51] Bano MC, Jackson CS, Magee AI. Pseudo-enzymatic S-acylation of a myristoylated yes protein tyrosine kinase peptide in vitro may reflect non-enzymatic S-acylation in vivo. *Biochem J* 1998;330:723–31.
- [52] Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, et al. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *Faseb J* 2004;18:439–56.
- [53] Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 2008;132:387–96.
- [54] Shindou H, Eto M, Morimoto R, Shimizu T. Identification of membrane O-acyltransferase family motifs. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;383:320–5.
- [55] Romero A, Kirchner H, Heppner K, Pfluger PT, Tschop MH, Nogueiras R. GOAT: the master switch for the ghrelin system? *Eur J Endocrinol* 2010;163:1–8.
- [56] Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA, et al. GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* 2009;15:741–5.
- [57] Aicart-Ramos C, Valero RA, Rodríguez-Crespo I. Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochim Biophys Acta* 2011;1808:2981–94.
- [58] Yap MC, Kostyuk MA, Martin DD, Perinpanayagam MA, Hak PG, Siddam A, et al. Rapid and selective detection of fatty acylated proteins using omega-alkynyl-fatty acids and click chemistry. *J Lipid Res* 2010;51:1566–80.
- [59] Duronio RJ, Towler DA, Heuckeroth RO, Gordon JI. Disruption of the yeast N-myristoyl transferase gene causes recessive lethality. *Science* 1989;243:796–800.
- [60] Ntwasa M, Aapies S, Schiffmann DA, Gay NJ. Drosophila embryos lacking N-myristoyltransferase have multiple developmental defects. *Exp Cell Res* 2001;262:134–44.
- [61] Yang SH, Shrivastav A, Kosinski C, Sharma RK, Chen MH, Berthiaume LG, et al. N-myristoyltransferase 1 is essential in early mouse development. *J Biol Chem* 2005;280:18990–5.
- [62] Price HP, Menon MR, Panethymitaki C, Goulding D, McKean PG, Smith DF. Myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase, an essential enzyme and potential drug target in kinetoplastid parasites. *J Biol Chem* 2003;278:7206–14.
- [63] Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet* 2009;41:1022–6.
- [64] Boutin JA. Myristoylation. *Cell Signal* 1997;9:15–35.
- [65] Mumby SM, Heuckeroth RO, Gordon JI, Gilman AG. G-protein alpha-subunit expression, myristoylation, and membrane association in COS cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:728–32.
- [66] Aderem AA, Albert KA, Keum MM, Wang JK, Greengard P, Cohn ZA. Stimulus-dependent myristoylation of a major substrate for protein kinase C. *Nature* 1988;332:362–4.
- [67] Selvakumar P, Lakshmiikuttyamma A, Dimmock JR, Sharma RK. Methionine aminopeptidase 2 and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2006;1765:148–54.
- [68] Borgese N, Agujaro D, Carrera P, Pietrini G, Bassetti M. A role for N-myristoylation in protein targeting: NADH-cytochrome b5 reductase requires myristic acid for association with outer mitochondrial but not ER membranes. *J Cell Biol* 1996;135:1501–13.
- [69] Beauchamp E, Goenaga D, Le Bloc'h J, Catheline D, Legrand P, Rioux V. Myristic acid increases the activity of dihydroceramide Delta4-desaturase 1 through its N-terminal myristoylation. *Biochimie* 2007;89:1553–61.
- [70] Ezanno H, le Bloc'h J, Beauchamp E, Lagadic-Gossman D, Legrand P, Rioux V. Myristic acid increases dihydroceramide Delta4-desaturase 1 (DES1) activity in cultured rat hepatocytes. *Lipids* 2012;47:117–28.
- [71] Peitzsch RM, McLaughlin S. Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* 1993;32:10436–43.
- [72] Lane KT, Beese LS. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J Lipid Res* 2006;47:681–99.
- [73] Robinson LJ, Busconi L, Michel T. Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995;270:995–8.
- [74] Wang J, Arbuzova A, Hangyas-Mihalyn G, McLaughlin S. The effector domain of myristoylated alanine-rich C kinase substrate binds strongly to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 2001;276:5012–9.
- [75] McLaughlin S, Aderem A. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem Sci* 1995;20:272–6.
- [76] Xu X, Ishima R, Ames JB. Conformational dynamics of recoverin's Ca²⁺-myristoyl switch probed by 15N NMR relaxation dispersion and chemical shift analysis. *Proteins* 2011;79:1910–22.
- [77] Beauchamp E, Tekpli X, Marteil G, Lagadic-Gossman D, Legrand P, Rioux V. N-Myristoylation targets dihydroceramide Delta4-desaturase 1 to mitochondria: partial involvement in the apoptotic effect of myristic acid. *Biochimie* 2009;91:1411–9.
- [78] Linder ME, Pang IH, Duronio RJ, Gordon JI, Sternweis PC, Gilman AG. Lipid modifications of G protein subunits. Myristoylation of Go alpha increases its affinity for beta gamma. *J Biol Chem* 1991;266:4654–9.
- [79] Kang R, Wan J, Arstikaitis P, Takahashi H, Huang K, Bailey AO, et al. Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation. *Nature* 2008;456:904–9.
- [80] Duncan JA, Gilman AG. A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS). *J Biol Chem* 1998;273:15830–7.
- [81] Fukata Y, Fukata M. Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2010;11:161–75.
- [82] Taguchi T, Misaki R. Palmitoylation pilots ras to recycling endosomes. *Small Gtpases* 2011;2:82–4.
- [83] Resh MD. Targeting protein lipidation in disease. *Trends Mol Med* 2012;18:206–14.
- [84] Linder ME, Deschenes RJ. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:74–84.
- [85] Yang J, Zhao TJ, Goldstein JL, Brown MS. Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:10750–5.
- [86] Barnett BP, Hwang Y, Taylor MS, Kirchner H, Pfluger PT, Bernard V, et al. Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor. *Science* 2010;330:1689–92.
- [87] Singh N, Wakil SJ, Stoops JK. On the question of half- or full-site reactivity of animal fatty acid synthetase. *J Biol Chem* 1984;259:3605–11.
- [88] Libertini LJ, Smith S. Purification and properties of a thioesterase from lactating rat mammary gland which modifies the product specificity of fatty acid synthetase. *J Biol Chem* 1978;253:1393–401.
- [89] Chambon M. Sources et monographies des principaux corps gras. In: Manuel des corps gras. Paris: Lavoisier Tec & Doc; 1992, p. 271–80.
- [90] Katan MB, Zock PL, Mensink RP. Effects of fats and fatty acids on blood lipids in humans: an overview. *Am J Clin Nutr* 1994;60:1017S–22S.
- [91] Legrand P, Rioux V. The complex and important cellular and metabolic functions of saturated fatty acids. *Lipids* 2010;45:941–6.
- [92] Faergeman NJ, Knudsen J. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J* 1997;323:1–12.
- [93] Lobo S, Greentree WK, Linder ME, Deschenes RJ. Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2002;277:41268–73.

- [94] Rioux V, Catheline D, Legrand P. In rat hepatocytes, myristic acid occurs through lipogenesis, palmitic shortening and lauric acid elongation. *Animal* 2007;1:820–6.
- [95] Johnson DR, Bhatnagar RS, Knoll LJ, Gordon JI. Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu Rev Biochem* 1994;63:869–914.
- [96] Johnson DR, Knoll LJ, Levin DE, Gordon JI. *Saccharomyces cerevisiae* contains four fatty acid activation (FAA) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. *J Cell Biol* 1994;127:751–62.
- [97] Rioux V, Galat A, Jan G, Vinci F, D'Andrea S, Legrand P. Exogenous myristic acid acylates proteins in cultured rat hepatocytes. *J Nutr Biochem* 2002;13:66–74.
- [98] Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, et al. Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology* 2005;146:2255–64.
- [99] ANSES. Opinion of 1 march 2010 of the French Food Safety Agency on the update of french population intakes (ANCs) for fatty acids. <http://www.afssa.fr/Documents/NUT2006sa0359EN.pdf>



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Review

Revisiting the metabolism and physiological functions of caprylic acid (C8:0) with special focus on ghrelin octanoylation

Fanny Lemarié, Erwan Beauchamp, Philippe Legrand, Vincent Rioux*

Laboratoire de Biochimie-Nutrition Humaine, Agrocampus Ouest, INRA USC 1378, Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2015

Accepted 1 August 2015

Available online xxx

Keywords:

Medium-chain saturated fatty acids

Caprylic acid

Octanoic acid

Octanoate

Metabolism

Ghrelin octanoylation

Acylation

ABSTRACT

Caprylic acid (octanoic acid, C8:0) belongs to the class of medium-chain saturated fatty acids (MCFAs). Dairy products and specific oils like coconut oil are natural sources of dietary C8:0 but higher intakes of this fatty acid can be provided with MCT (Medium-Chain Triglycerides) oil that consists in 75% of C8:0. MCFAs have physical and metabolic properties that are distinct from those of long-chain saturated fatty acids (LCFAs ≥ 12 carbons). Beneficial physiological effects of dietary C8:0 have been studied for a long time and MCT oil has been used as a special energy source for patients suffering from pancreatic insufficiency, impaired lymphatic chylomicron transport and fat malabsorption. More recently, caprylic acid was also shown to acylate ghrelin, the only known peptide hormone with an orexigenic effect. Through its covalent binding to the ghrelin peptide, caprylic acid exhibits an emerging and specific role in modulating physiological functions themselves regulated by octanoylated ghrelin. Dietary caprylic acid is therefore now suspected to provide the ghrelin O-acyltransferase (GOAT) enzyme with octanoyl-CoA co-substrates necessary for the acyl modification of ghrelin. This review tries to highlight the discrepancy between the formerly described beneficial effects of dietary MCFAs on body weight loss and the C8:0 newly reported effect on appetite stimulation *via* ghrelin octanoylation. The subsequent aim of this review is to demonstrate the relevance of carrying out further studies to better understand the physiological functions of this particular fatty acid.

© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Caprylic acid (octanoic acid, C8:0) belongs to the class of medium-chain saturated fatty acids (MCFAs) which also includes caproic acid (C6:0) and capric acid (C10:0). MCFAs are characteristic nutrients present in dairy products [1] and in specific oils like palm kernel and coconut oils [2]. They display physical and metabolic properties that are distinct from those of long-chain saturated fatty acids (LCFAs ≥ 12 carbons), leading to their rapid gastro-intestinal hydrolysis and absorption, specific transport through the portal vein and rapid beta-oxidation in the liver [3]. In the past, these metabolic specificities leading to a high catabolism and low tissue

storage [4] have been associated with beneficial or neutral physiological effects of dietary MCFAs, compared with LCFAs. More recently, the discovery of stomach ghrelin as the endogenous ligand of growth hormone secretagogue receptor 1a (GHSR-1a) [5] and the description of its essential and unique post-translational octanoylation catalyzed by the ghrelin O-acyltransferase (GOAT) [6,7] has added a new level of complexity in the understanding of the physiological functions regulated by dietary C8:0.

In the present review, we therefore revisit the knowledge on this fatty acid (FA), focusing on the discrepancy between the historically described beneficial effects of dietary MCFAs (including C8:0) on body weight and fat loss and its newly reported effect on food consumption and appetite stimulation *via* ghrelin octanoylation.

2. Food sources and biosynthesis of caprylic acid in animals

Natural food sources of caprylic acid are restricted to specific vegetable oils and milk products. Caprylic acid is abundant in coconut oil (6–10% of FAs, with C8:0 mainly in sn-1 and -3 positions

Abbreviations: FFA, free fatty acid; GH, growth hormone; GOAT, ghrelin O-acyltransferase; GHSR-1a, growth hormone secretagogue receptor 1a; LCFA, long-chain fatty acid; LCT, long-chain triglyceride; MCFA, medium-chain fatty acid; MCT, medium-chain triglyceride; PUFA, polyunsaturated fatty acid; TG, triglyceride.

* Corresponding author. Laboratoire de Biochimie-Nutrition Humaine, Agrocampus Ouest, INRA USC 1378, 65 rue de Saint-Brieuc, CS 84215, 35042 RENNES Cedex, France.

E-mail address: vincent.rioux@agrocampus-ouest.fr (V. Rioux).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.08.002>

0300-9084/© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

on the triglycerides, TG) and in palm kernel oil (2–5% of FAs) [8]. These two edible oils are also characterized by high amounts of capric acid (5–10% and 3–5% of FAs, respectively) and lauric acid (39–54% and 44–51% of FAs). Milk is the only natural source of animal caprylic acid with strong differences between mammalian species. C8:0 represents about 0.5% of FAs in human milk [9], but is higher in cow milk (1–2%) [1], in goat milk (3%) [10], in rat milk (5–6%) [11] and reaches up to 15–18% in rabbit milk [12]. Caprylic acid and other MCFAs are primarily esterified in sn-3 position of the TGs in cow [1], rat [13] and human [9] milks.

De novo synthesis of short to medium chain saturated FAs (C4:0 to C10:0) in the mammary gland of ruminant species, catalyzed by the thioesterase I included in the Fatty Acid Synthase (FAS) complex and leading to their presence in ruminant milk, has been well documented [14]. In the lactating mammary gland of non-ruminant mammalian species, the presence of a cytosolic thioesterase II [15], independent of the FAS complex, explains the synthesis of saturated FAs (SFAs) with 6–14 carbons. Peroxisomal beta-oxidation leading to chain-shortening of C16:0 to C14:0 has also been described in hepatocytes [16]. However, such a mechanism leading to the endogenous synthesis of C8:0 has not been described in animal tissues.

In western diets, total MCFAs represent therefore less than 2% of dietary energy with caprylic acid being predominantly provided by milk fat. The dietary level of caprylic acid and other MCFAs may be higher in some Asian countries consuming coconut or palm kernel oils [2]. The Medium Chain Triglyceride (MCT) oil, produced from coconut oil and made up with 75–80% of C8:0, can be consumed to increase the intake of dietary C8:0. MCT oil is currently used for clinical purposes only, in oral or enteral nutrition when the digestion, absorption or transport of Long Chain Triglycerides (LCT) is impaired, or in parenteral nutrition when rapid energy supply is needed. Diets highly enriched with MCT (40–60% of energy) have also been used as an alternative to ketogenic diets for the potential treatment of neurological disorders [17].

3. Digestion and absorption of dietary lipids containing caprylic acid

The digestion of dietary fat is a complex and dynamic process which starts in the upper gastrointestinal tract under the action of preduodenal lipase (gastric lipase in humans or its homologous lingual lipase in rats [11]) and is completed in the small intestine by pancreatic lipase (Fig. 1). Although the existence and functional importance of a preduodenal lipase has been disputed in the past [18], it is now described as contributing to 15–20 % of the whole lipolysis process [19]. Preduodenal lipase is described as playing two important roles: first, in driving the early release of short and medium chain SFAs, including caprylic acid, secondly in triggering the subsequent action of pancreatic lipase [20]. Part of MCFAs coming from dietary MCTs or milk TGs may therefore be directly absorbed by the stomach mucosa [12], as shown by studies using radiolabelled lipids administered to suckling rats [21,22]. However, the amounts of FAs involved in this gastric absorption, the mechanism of absorption (which could be a simple diffusion) [21] and the subsequent gastric metabolic fate of these MCFAs still haven't been clearly described [12,23]. They may depend on physiological parameters such as age (neonates vs. adult). Since gastric lipase shows a stereo-preference for the hydrolysis of ester bonds at the sn-3 position of TGs [24], this process is particularly adapted in the context of dairy fat digestion [23], to release the MCFAs located predominantly at this position [13].

Then, MCFAs which have escaped the absorption at the gastric level are absorbed by small intestinal cells, like LCFAs, after the subsequent action of duodenal pancreatic lipase on both dietary

remaining MCTs and LCTs (Fig. 1). However, unlike LCFAs which are re-esterified with 2-monoglycerides into TGs in enterocytes and incorporated into chylomicrons which then enter the lymphatic system, MCFAs are directly transferred to the portal circulation and transported as free fatty acids (FFAs) with albumin to the liver [25].

4. Cellular metabolism of caprylic acid

Dietary MCFAs coming from the portal circulation are directly taken up by the liver and rapidly subjected to mitochondrial beta-oxidation [26], since they easily enter the mitochondria independently of the carnitine transport system, as opposed to LCFAs [27]. Once inside the liver mitochondria, MCFAs are activated by medium-chain acyl CoA synthetases [28], forming CoA derivatives which are catabolized. In addition to the mitochondrial beta-oxidation, peroxisomal beta-oxidation may participate in their overall oxidation process even if LCFAs are more subjected to this pathways [29]. Omega-oxidation of MCFAs may occur in the endoplasmic reticulum (ER) and in the cytoplasm when the mitochondrial beta-oxidation is exceeded, leading to the synthesis of dicarboxylic acids [30]. Conversely, the potential use of dietary C8:0 for glycerolipid esterification appears very limited [27], except in hepatocytes isolated from rabbits at birth [31], which disappears in older rabbit. In hepatocytes isolated from adult rats initially fed with a low-fat diet or high-fat diets composed of MCTs or LCTs, the rates of [1-¹⁴C]-caprylic acid oxidation was similarly high [32]. Even when administered intravenously and not orally in rats, radiolabeled tricaprylin led to a high incorporation of radioactivity (90% after 24 h) in expired CO₂ and poor radioactive incorporation into cellular lipids [33]. In some cases, depending on the amount of dietary MCFAs and the duration of the diet, the high level of hepatic beta-oxidation may lead to an acetyl-CoA concentration exceeding the Krebs cycle capacity. In these cases, acetyl-CoA is known to be directed towards ketone body production [32] or *de novo* synthesis of LCFAs [34].

In some other particular cases, when MCFAs are supplied massively in very young infants fed with commercial formula containing up to 30% C8:0 [35] or in rats fed during 6 weeks with high fat MCT oil (46.8% of energy) [36], MCFAs have also been detected in adipose tissue. This suggested either that a modest part of dietary MCFAs coming from excessive consumption can be transported by chylomicrons after intestinal absorption or that their liver uptake from the portal circulation was not complete, allowing them to reach the peripheral tissues. Their liver beta-oxidation could also be incomplete, therefore allowing them to be re-esterified into TGs and secreted as VLDL. Nevertheless, rats fed with high fat MCT oil [36] had smaller fat pads and number of key adipogenic genes were down-regulated, including the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (PPAR gamma).

5. Physiological effects of dietary caprylic acid

5.1. Dietary caprylic acid and fat deposition

The metabolic specificities of MCFAs (i.e. rapid gastro-intestinal hydrolysis and absorption, specific transport through the portal vein and rapid beta-oxidation in the liver) leading to a high catabolism and low tissue storage especially in adipose tissue [4], have been associated with beneficial physiological effects compared with LCFAs. Indeed, a diminished deposition of fat was reported in rats overfed with MCT diets compared with LCT diets [36–39]. In overweight humans, intakes of equal-caloric diets rich in MCFAs was shown to decrease adiposity and increase energy expenditure compared to similar diets rich in LCFAs [40–42]. In these nutritional experiments, MCT oil contained both caprylic acid

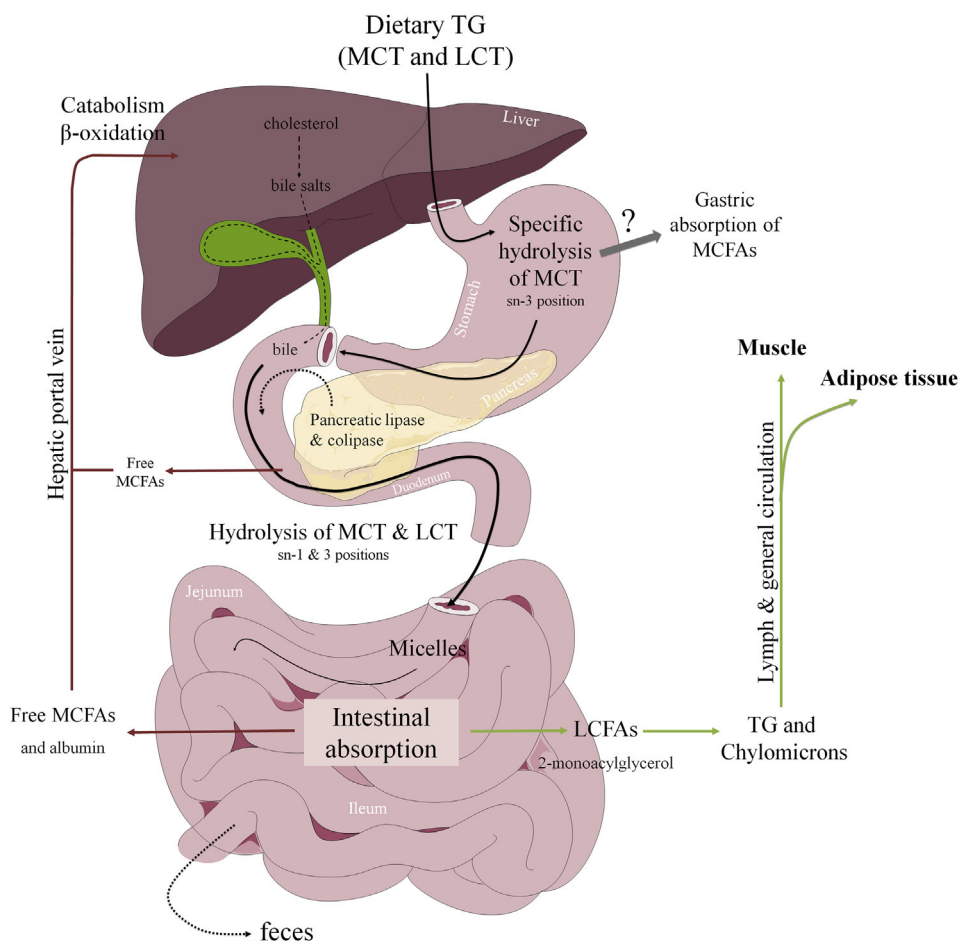


Fig. 1. Known digestion and absorption mechanisms of Medium Chain Saturated Fatty Acids (MCFAs). After the ingestion of dietary triglycerides (TGs), the digestion of Medium Chain Triglycerides (MCTs) starts in the upper gastrointestinal tract under the action of preduodenal lipase (gastric or lingual depending on the specie) and is completed in the small intestine by pancreatic lipase. The gastric lipase shows a stereo-preference for the hydrolysis of ester bonds at the sn-3 position of TGs. The early release of part of MCFAs might lead to their gastric absorption by the stomach mucosa. Other MCFAs are then classically absorbed by small intestinal cells after the action of the duodenal pancreatic lipase on dietary remaining MCTs. These MCFAs are directly transferred to the portal circulation and transported as free fatty acids (FFAs) with albumin to the liver where they are beta-oxidized. Comparatively, LCFAs are hydrolyzed by the duodenal pancreatic lipase, absorbed in the intestine, re-esterified with 2-monoacylglycerol into TGs in enterocytes, incorporated into chylomicrons which then enter the lymphatic system and transferred to muscles and adipose tissues (illustrations used elements from Servier Medical Art: <http://www.servier.fr/smart>).

(75% of FAs) and capric acid (25%). MCT-enriched diets have also been used for clinical conditions associated with increased energy needs, for the nutritional management of patients with metabolic disorders like beta-oxidation troubles. They are also potentially beneficial for patient with cardiac diseases [43].

However, the real usefulness of dietary MCTs in body weight control is still under controversy and Bach et al. [4] suggested that it would be necessary to get more than 50% of energy as MCFAs to achieve a real weight loss in humans. A systematic review of the literature on the influence of MCTs on consumption and weight gain in rats concluded that MCTs had effectively a short-term reducing effect on these parameters but that this effect disappeared in the long-term studies [44], probably due to metabolic adaptation to such a food. Another hypothesis for explaining the beneficial effects of MCT is their inhibitory effect on apoB synthesis, reducing the VLDL secretion by hepatocytes. This has been observed with octanoate in chicken hepatocytes [45].

5.2. Dietary caprylic acid and plasma lipid markers

Concerning plasma lipid markers in humans, neutral or even decreasing effects of dietary MCFAs have been shown on circulating

cholesterol and triglycerides, when they are provided at moderate levels (<10% of total energy) [46–49]. When provided in excess however (more than 35% of total energy), some studies have not surprisingly shown deleterious effects of dietary MCFAs on both plasma triglycerides and cholesterol in humans [50–53]. When compared with similar amounts of dietary linoleic acid, daily feeding with 60 g C8:0 and C10:0 for 3 weeks reduced VLDL lipolysis and uptake in humans, but again this dietary amount largely exceeded common doses of MCFAs [54]. Finally, epidemiological studies have shown that intakes of short to medium-chain SFAs were not significantly associated with the risk of coronary heart disease (CHD) [48,55,56]. These data suggest that it is important to remind that SFAs can no longer be considered as a single group in terms of structure, metabolism and physiological effects [57].

5.3. Dietary MCFAs and polyunsaturated FA (PUFA) bioavailability

Dietary MCFAs may also increase the availability of PUFAs. Indeed, the substitution of olive oil for butterfat containing short and medium chain SFAs [58] was shown to increase the storage of alpha-linolenic acid (ALA) in adipose tissue, plasma and liver, the

concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) in adipose tissue and red blood cells and the level of docosapentaenoic acid (DPA) in the liver, heart and retina in the rat. Moreover, in ALA-deficient post-weaning rats, it has been shown that a dairy fat-based diet (with short and medium chain FAs at 6.1% of FAs) providing 1.5% of FAs as ALA (0.3% of energy) increases DHA levels in the brain [59,60] more efficiently than a palm oil blend (with no short and medium chain FAs, but with 36.2% of palmitic acid) containing a similar level of ALA. In the plasma of male offspring rats from mother rats supplemented with butter, DHA was also significantly higher than in pups from mothers supplemented with olive oil and margarine [61]. These studies suggested therefore that some effects can be attributed to short and medium chain SFAs of dairy origin. Because a high percentage (60–85%) of dietary ALA is rapidly directed toward beta-oxidation [62], the suggested mechanism is that its concomitant presence with MCFAs that are highly susceptible to beta-oxidation may lead to its sparing, increased cellular storage and better conversion to DHA [63].

In addition, even directly supplemented with 0.12% DHA (which corresponds to the current level of DHA in infant formula), a palm oil blend providing 1.5% ALA was less efficient than a dairy fat-based diet also containing 1.5% (but no DHA) for increasing brain DHA in young ALA-deficient post-weaning rats [59]. This result suggested other potential mechanisms of MCFAs on brain DHA accumulation in this animal model.

5.4. Antiviral and antibacterial roles of caprylic acid

Free fatty acids (FFAs) are known for their ability to inhibit the growth or kill bacteria and viruses [64]. Even though the mechanism of action by which FFAs act on bacteria is poorly understood, it is likely that they disrupt the electron transport chain and oxidative phosphorylation of the membrane cell, impair the nutrient uptake and inhibit some enzyme activities [65]. For viruses, MCFAs and associated monoglycerides affect the viral envelope, causing leakage and disintegration of the envelope at high concentrations [66]. In most studies testing the antibacterial and anti-viral effects of a range of FFAs, capric acid (C10:0) was the most effective FA. Caprylic acid had a narrow spectrum of microbicidal activity against viruses and bacteria compared with C10:0 but exerted nevertheless anti-bacterial (gram positive) [67], anti-viral [68], anti-algal [69] and anti-protozoan [70] effects making it an attractive agent for medicinal or agricultural applications.

6. Caprylic acid and ghrelin octanoylation

6.1. General aspects on the fatty acid acylation of proteins

Fatty acid acylation of proteins [71] corresponds to the co- or post-translational covalent linkage of a fatty acid, activated in the form of acyl-CoA, to an amino-acid residue of the substrate protein (Fig. 2). The cellular FAs which are involved in protein acylation are mainly SFAs. Palmitoylation (S-acylation) corresponds to the reversible attachment of palmitic acid (C16:0) to the side chain of a cysteine residue *via* a thioester bond [72]. N-terminal myristoylation refers to the covalent attachment of myristic acid (C14:0) by an amide bond to the N-terminal glycine of many eukaryotic and viral proteins [73]. Octanoylation (O-acylation) typically concerns the formation of an ester bond between caprylic acid and the side chain of a serine residue of the stomach ghrelin peptide [5]. An increasing number of proteins (enzymes, receptors, oncogenes, tumor suppressors, proteins involved in signal transduction, eukaryotic and viral structural proteins) have been shown to undergo fatty acid acylation. The acyl moiety can mediate protein subcellular localization, protein–protein interaction or protein–

membrane interaction. Therefore, through the covalent modification of proteins, SFAs exhibit emerging specific and important roles in modulating protein functions [74].

6.2. Ghrelin synthesis and octanoylation by GOAT

Recently, caprylic acid was shown to acylate ghrelin [5], the only known peptide hormone with an orexigenic effect. Ghrelin is a 28 amino acid peptide expressed in the digestive tract and mainly in the stomach and its acylated form binds to the growth hormone secretagogue receptor (GHSR-1a) located in the pituitary gland and hypothalamus [75]. Acylated ghrelin regulates many relevant biological processes including the secretion of the growth hormone (GH), the stimulation of appetite and food intake, the modulation of gastric acid secretion and motility, the regulation of glucose homeostasis and adiposity [76].

During its maturation in the gastric mucosa and before secretion in the blood (Fig. 3), the proghrelin is cleaved and part of the proghrelin is octanoylated on its N-terminal 3rd serine residue, in the ER lumen. The ghrelin O-acyltransferase (GOAT or MBOAT4), the gastric enzyme involved in ghrelin octanoylation, belongs to the family of membrane bound O-acyltransferases (MBOAT), a group of proteins involved in acetyltransferase and acyltransferase activity [6]. This enzyme is described by some authors as a “fat sensor” informing the brain, *via* the acylated ghrelin level, of the nutrient availability in the digestive tract [77]. The GOAT is a polypeptidic ER membrane protein with 11 transmembrane helices and one reentrant loop [77]. The GOAT expression is widely distributed in human tissues and corresponds predominantly to the distribution of the ghrelin [78] with a strong co-expression in the mucosa of the digestive tract. Studies showed that GOAT displays a high affinity for caprylic acid but can also link ghrelin to C6:0, C10:0 and C10:1 to a lesser extent [79]. Little is still known about the GOAT enzymatic mechanism and the analysis of native gastric GOAT activity still remains a challenge [80].

Whether acylated or not, the proghrelin is then subjected to a second cleavage under the action of a prohormone convertase (Fig. 3) which leads to the production of the native ghrelin peptide (acylated or not) and to an additional C-terminal peptide which can itself undergo further proteolytic processes generating a smaller peptide called obestatin [81]. The mature acylated ghrelin secreted in the plasma is the only form that can bind to its GHSR-1a receptor. However, unacylated ghrelin can also be secreted and seems involved in the regulation of several physiological functions [82]. The secretion of unacylated and acylated ghrelin in the plasma is modulated by several receptors like FFAR1 and 2/3 (Free Fatty Acid Receptor), or GPR120 and 40 (G protein-coupled receptors) activated by LCFAs and MCFAs [83,84]. Ghrelin is the only known case of a peptide covalently linked to caprylic acid.

Concerning now the 23 amino acid peptide called obestatin (Fig. 3) which is derived from the C-terminal tail of proghrelin [81], it has been first described as the endogenous ligand of the orphan G-protein-coupled receptor GPR39 [81,85] with an anorexigenic effect in rats treated with obestatin injections. However, these findings are now controversial [86–88], even if some studies showed that obestatin could counteract the ghrelin-induced food intake and GH secretion in rodents, when co-administered with ghrelin at equimolar doses [89,90].

6.3. Origin of caprylic acid used for octanoylation and effect of dietary caprylic acid on the level of acylated ghrelin

Because of the potential specific gastric absorption of MCFAs following the consumption of MCTs, dietary caprylic acid is now suspected to directly provide GOAT enzyme with octanoyl-CoA co-

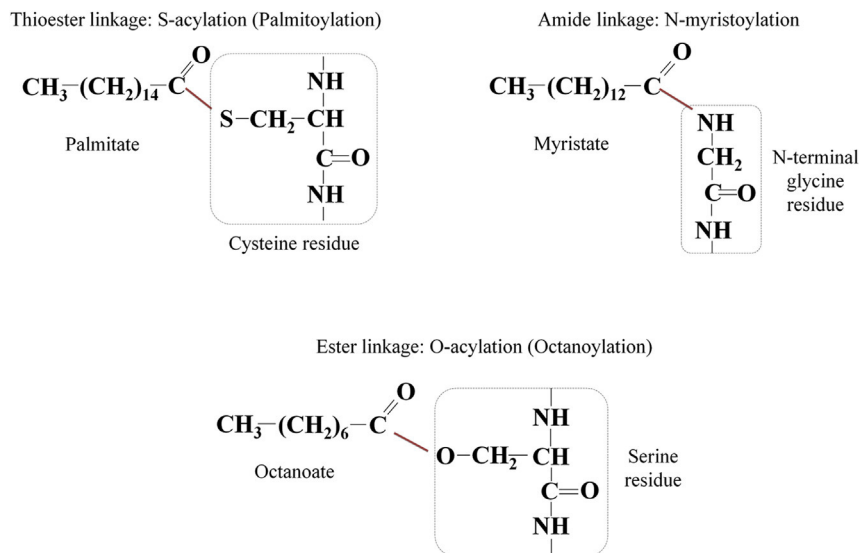


Fig. 2. Classification of the saturated fatty acid protein acylation. Palmitoylation (S-acylation) corresponds to the reversible attachment of palmitic acid (C16:0) to the side chain of a cysteine residue via a thioester bond. N-terminal myristoylation refers to the covalent attachment of myristic acid (C14:0) by an amide bond to the N-terminal glycine of many eukaryotic and viral proteins. Octanoylation (O-acylation) typically concerns the formation of an ester bond between octanoic acid (caprylic acid, C8:0) and the side chain of a serine residue of the stomach ghrelin peptide.

substrate necessary for the acyl modification of ghrelin (Fig. 4). Indeed, ingestion by mice of either MCFAs or MCTs increased the stomach concentration of acylated ghrelin [91], without changing

the total ghrelin amounts. Nishi et al. detected heptanoylghrelin [91] or decanoylghrelin [92] in the stomachs of mice fed with triheptanoin or tricaprin, confirming that at least part of the ingested

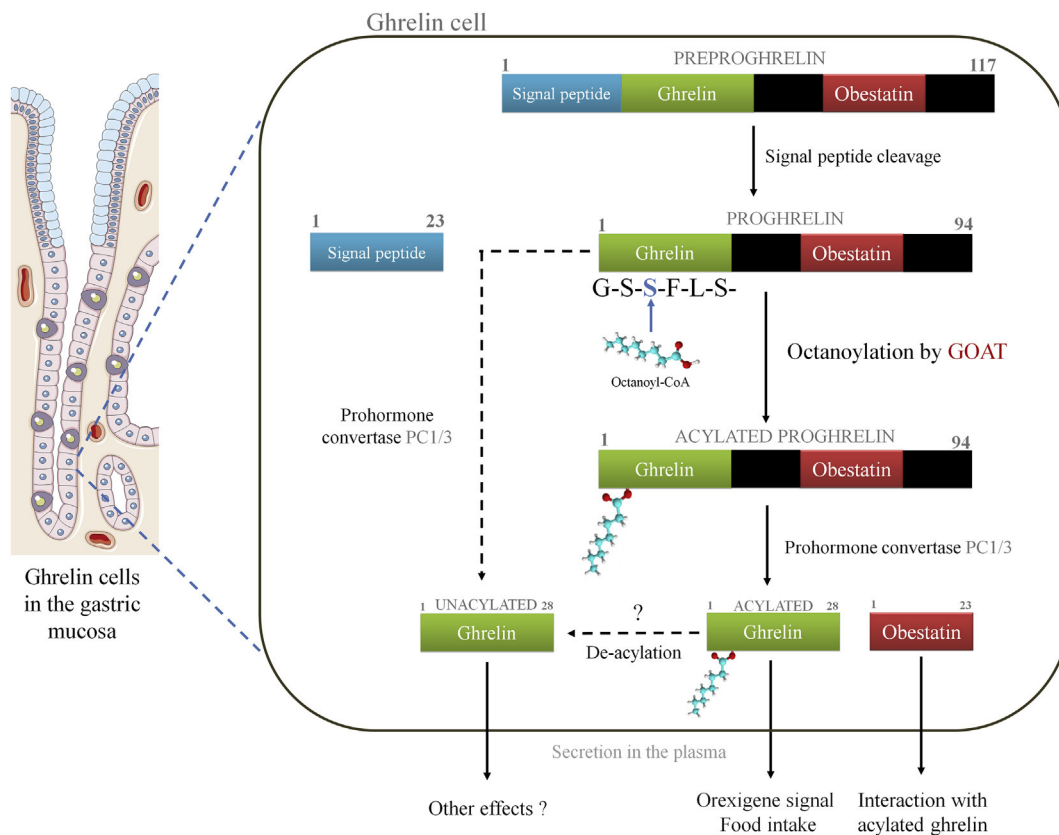


Fig. 3. Ghrelin maturation and post-translational octanoylation. In “ghrelin cells” located in the gastric mucosa, the preproghrelin is first translated from its corresponding gene and its signal peptide is cleaved in the endoplasmic reticulum to form the proghrelin. Part of the proghrelin is octanoylated on its N-terminal 3rd serine residue. The acylated proghrelin is cleaved on its C-terminal extremity under the action of the prohormone convertase 1/3. The C-terminal extremity is also cleaved in a 23 amino acid peptide secreted in the plasma, called obestatin. Acylated and unacylated ghrelin are secreted in the plasma but only the acylated form can bind to its GHSR-1a receptor (illustrations used elements from Servier Medical Art: <http://www.servier.fr/smart>).

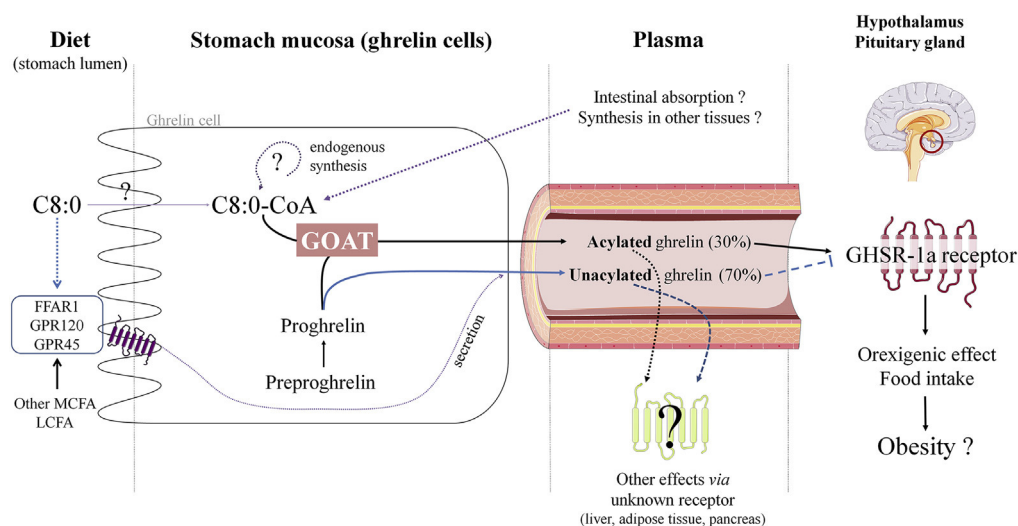


Fig. 4. Hypothesis for the mechanism linking dietary caprylic acid and its physiological effects via ghrelin octanoylation (illustrations used elements from Servier Medical Art: <http://www.servier.fr/smart>).

MCFAs was directly used for ghrelin acylation. These results are consistent with the hypothesis of gastric absorption of MCTs but part of the caprylic acid present in the stomach may also come from intestinal absorption followed by uncompleted uptake by the liver (Fig. 4).

The increase of plasma acylated ghrelin concentration before meals [93], although MCFAs are not present in the stomach lumen, and the scarcity of food providing MCFAs, also suggest a possible endogenous synthesis of the C8:0 used for ghrelin octanoylation. This hypothetical endogenous synthesis could be located in stomach cells or could take place in another tissue followed by transport in the plasma toward the octanoylation site. A specific storage of this FA at the ghrelin octanoylation site can also be considered. In a recent study, stomach tissues of rats fed during 6 weeks with a diet deprived of C8:0 displayed however a very low but detectable amount of C8:0 [94].

The influence of the availability of dietary C8:0 in the gastric lumen and in the gastric cells on the concentrations of circulating acylated ghrelin, after the action of the gastric GOAT enzyme, remains unclear and more studies are needed (Fig. 4). Recent papers have suggested that inhibiting the GOAT activity might be a therapeutic target against obesity and hyperphagia [95], in order to decrease the circulating level of acylated ghrelin (which may also be obtained by limiting the availability of its substrate C8:0).

However, the maturation and secretion of stomach acylated ghrelin are complex processes potentially regulated by dietary LCFAs, MCFAs and GPR120 [96]. The circulating ghrelin is additionally submitted to clearance and rapid de-acylation or degradation. For instance, a ghrelin deacylation enzyme (acyl-protein thioesterase-1, APT1) has recently been described, that can de-acylate ghrelin in the plasma [97]. Moreover, acylated ghrelin has been shown to form a complex with larger proteins like immunoglobulins (Ghrelin-reactive IgG) [98] that protects the acylated form from degradation. Some studies assaying total ghrelin in plasma have also reported lower levels in obese subjects, due to lower levels of unacylated ghrelin, whereas acylated ghrelin remained stable, suggesting a specific decreased degradation of acylated ghrelin in obese [98]. In humans, it has also been shown that the GOAT enzyme was present in the blood, which could modify the balance between de-acylation and re-acylation [99]. For all these reasons, the concentration of both the acylated and unacylated plasma ghrelin may not simply reflect the stomach

concentration [100].

In ruminants, the ingestion of MCFAs during 2 weeks by lactating dairy cows increased the plasma acylated ghrelin concentrations [101]. In cachectic patients, a 2-week administration of an enteral nutrition formula containing 3 g/day of caprylic acid enhanced plasma octanoylated ghrelin and also improved the body mass index [102]. A single administration of the formula also increased plasma octanoylated ghrelin 5 h after administration. Conversely, in another study on the role of the gustatory G-protein in the sensing of FAs for octanoylation of ghrelin, ingested MCFAs increased stomach acylated ghrelin but did not change the plasma ghrelin concentration [83]. To further understand the effect of dietary caprylic acid on the concentration of circulating plasma acylated and unacylated ghrelin, we recently designed a nutritional study [94] including Sprague–Dawley male rats which were fed during 6 weeks with three dietary C8:0 levels (0, 8 and 21% of FAs). A specific dose–response enrichment of the stomach tissue C8:0 was observed. However, the acylated ghrelin concentration in the plasma was unchanged in spite of the increased C8:0 availability. Conversely, a reproducible decrease in the plasma concentration of unacylated ghrelin was observed, which was consistent with a decrease in the stomach preproghrelin mRNA and stomach ghrelin expression. Additionally, we measured high levels of acylated ghrelin in the plasma of rats receiving no dietary C8:0. Thus, the low stomach C8:0 level observed in these rats could be enough to supply the octanoyl-CoA co-substrate used to acylate the proghrelin [94]. Therefore, depending on the experimental model, nutritional doses and diet duration, the impact of dietary MCFAs or MCTs on the acylation and activation of ghrelin may be different [103].

6.4. Physiological functions of acylated and unacylated ghrelin

As mentioned above, plasma ghrelin exists in both unacylated and acylated forms, but only the active acylated form can bind its GHSR-1a receptor [75]. Although circulating acylated ghrelin was generally described as 10% of total circulating ghrelin in humans [104], unacylated ghrelin concentration has been overestimated due to the quick degradation of acylated ghrelin [105]. It seems that acylated ghrelin could actually represent around 30–50 % of the total ghrelin in humans and rodents [91]. Octanoylated ghrelin is best known for its orexigenic actions in the central nervous system,

involved in the regulation of food intake and thereby in weight control [106]. The first studies showed that intracerebral chronic acylated ghrelin administration increased body weight by stimulating food intake and by inhibiting energy expenditure and fat catabolism [107]. However, as demonstrated in recent studies showing that ghrelin-null mice did not exhibit altered food intake nor altered expression of hypothalamic neuropeptides involved in the regulation of appetite, the essentiality of endogenous ghrelin in the regulation of food intake appeared controversial [108]. For instance, Nishi et al. [92] found no effect on body weight and food intake after feeding mice during two weeks with diets enriched in tricaprilyn or tricaprinn compared to control diets. Similarly, GOAT-null mice fed with a standard chow diet had normal body weight and fat mass [109]. However, feeding GOAT-null mice with MCT-enriched diets during 8 weeks resulted in significantly lower body weight compared with control mice [109].

Concerning plasma glucose levels, octanoylghrelin was first described as a modulator of glucose homeostasis. Recently however, the implication of the GOAT-ghrelin system has once again been shown as unessential in the maintenance of euglycemia during prolonged calorie restriction [110].

7. Conclusion

In this review, we have reported new knowledge on the cellular and physiological functions of caprylic acid. This review shows that more research is needed to improve our understanding of (i) the origin of caprylic acid which is used to acylate ghrelin in the stomach, (ii) the effect of increasing dietary caprylic acid levels on the C8:0 available in the stomach and other tissues, (iii) the subsequent effect of increasing dietary caprylic acid levels on the concentration of circulating plasma acylated and non-acylated ghrelin and (iv) the overall effect of increasing dietary caprylic acid levels (including its action *via* ghrelin acylation). Focusing on C8:0, this review also shows that SFAs should no longer be considered as a single group in terms of structure, metabolism, functions and even deleterious effects in case of excess [111].

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank J. Wilson-Giron for her English revision of the manuscript.

References

- [1] R.G. Jensen, A.M. Ferris, C.J. Lammi-Keefe, R.A. Henderson, Lipids of bovine and human milks: a comparison, *J. Dairy Sci.* 73 (1990) 223–240.
- [2] H. Takeuchi, S. Sekine, K. Kojima, T. Aoyama, The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 17 (Suppl. 1) (2008) 320–323.
- [3] A.C. Bach, V.K. Babayan, Medium-chain triglycerides: an update, *Am. J. Clin. Nutr.* 36 (1982) 950–962.
- [4] A.C. Bach, Y. Ingenbleek, A. Frey, The usefulness of dietary medium-chain triglycerides in body weight control: fact or fancy? *J. Lipid Res.* 37 (1996) 708–726.
- [5] M. Kojima, H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, K. Kangawa, Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach, *Nature* 402 (1999) 656–660.
- [6] J.A. Gutierrez, P.J. Solenberg, D.R. Perkins, J.A. Willency, M.D. Knierman, Z. Jin, et al., Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 6320–6325.
- [7] J. Yang, M.S. Brown, G. Liang, N.V. Grishin, J.L. Goldstein, Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone, *Cell* 132 (2008) 387–396.
- [8] A. Karleskind, *Manuel des corps gras*, 1992.
- [9] R.G. Jensen, The lipids in human milk, *Prog. Lipid Res.* 35 (1996) 53–92, [http://dx.doi.org/10.1016/0163-7827\(95\)00010-0](http://dx.doi.org/10.1016/0163-7827(95)00010-0).
- [10] L. Alonso, J. Fontecha, L. Lozada, M.J. Fraga, M. Juárez, Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids, *J. Dairy Sci.* 82 (1999) 878–884, [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75306-3](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75306-3).
- [11] G.J. Fernando-Warnakulasuriya, J.E. Stagers, S.C. Frost, M.A. Wells, Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. I. Fatty acid composition and concentrations of major lipid components, *J. Lipid Res.* 22 (1981) 668–674.
- [12] J.P. Perret, Gastric lipolysis of maternal milk triglycerides, and gastric absorption of medium chain fatty acids in the young rabbit (author's transl), *J. Physiol. Paris* 76 (1980) 159–166.
- [13] J.E. Stagers, G.J. Fernando-Warnakulasuriya, M.A. Wells, Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. II. Triacylglycerols: molecular species, stereospecific analysis, and specificity of hydrolysis by lingual lipase, *J. Lipid Res.* 22 (1981) 675–679.
- [14] S. Kumar, P.F. Dodds, Fatty acid synthase from lactating bovine mammary gland, *Methods Enzymol.* 71 Pt C (1981) 86–97.
- [15] L.J. Libertini, S. Smith, Purification and properties of a thioesterase from lactating rat mammary gland which modifies the product specificity of fatty acid synthetase, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 1393–1401.
- [16] V. Rioux, D. Catheline, P. Legrand, In rat hepatocytes, myristic acid occurs through lipogenesis, palmitic shortening and lauric acid elongation, *Animal* 1 (2007) 820–826.
- [17] L.B. Gano, M. Patel, J.M. Rho, Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 2211–2228, <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.R048975>.
- [18] S.B. Clark, B. Brause, P.R. Holt, Lipolysis and absorption of fat in the rat stomach, *Gastroenterology* 56 (1969) 214–222, [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(69\)80120-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(69)80120-4).
- [19] F. Carrière, J.A. Barrowman, R. Verger, R. Laugier, Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans, *Gastroenterology* 105 (1993) 876–888.
- [20] Y. Gargouri, G. Pieroni, C. Rivière, P.A. Lowe, J.F. Saunière, L. Sarda, et al., Importance of human gastric lipase for intestinal lipolysis: an in vitro study, *Biochim. Biophys. Acta* 879 (1986) 419–423.
- [21] T. Egelrud, T. Ollvecrona, H. Helander, Studies on gastric absorption of lipids in the suckling rat, *Scand. J. Gastroenterol.* 6 (1971) 329–333, <http://dx.doi.org/10.3109/00365527109181129>.
- [22] T.Y. Aw, M.R. Grigor, Digestion and absorption of milk triacylglycerols in 14-day-old suckling rats, *J. Nutr.* 110 (1980) 2133–2140.
- [23] H.C. Lai, D.M. Ney, Gastric digestion modifies absorption of butterfat into lymph chylomicrons in rats, *J. Nutr.* 128 (1998) 2403–2410.
- [24] F. Carrière, E. Rogalska, C. Cudrey, F. Ferrato, R. Laugier, R. Verger, In vivo and in vitro studies on the stereoselective hydrolysis of tri- and diglycerides by gastric and pancreatic lipases, *Bioorg. Med. Chem.* 5 (1997) 429–435.
- [25] Y.Q. You, P.R. Ling, J.Z. Qu, B.R. Bistran, Effects of medium-chain triglycerides, long-chain triglycerides, or 2-monododecanoin on fatty acid composition in the portal vein, intestinal lymph, and systemic circulation in rats, *J. Parenter. Enter. Nutr.* 32 (2008) 169–175.
- [26] K. Ooyama, K. Kojima, T. Aoyama, H. Takeuchi, Decrease of food intake in rats after ingestion of medium-chain triacylglycerol, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. Tokyo* 55 (2009) 423–427.
- [27] A.A. Papamandjaris, D.E. MacDougall, P.J. Jones, Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: obesity treatment implications, *Life Sci.* 62 (1998) 1203–1215.
- [28] I. Boomgaarden, C. Vock, M. Klapper, F. Döring, Comparative analyses of disease risk genes belonging to the acyl-CoA synthetase medium-chain (ACSM) family in human liver and cell lines, *Biochem. Genet.* 47 (2009) 739–748, <http://dx.doi.org/10.1007/s10528-009-9273-z>.
- [29] F.A. Reubsaeft, J.H. Veerkamp, S.G. Bukkens, J.M. Trijbels, L.A. Monnens, Acyl-CoA oxidase activity and peroxisomal fatty acid oxidation in rat tissues, *Biochim. Biophys. Acta* 958 (1988) 434–442.
- [30] E. Christensen, M. Grønn, T.A. Hagve, B.O. Christophersen, Omega-oxidation of fatty acids studied in isolated liver cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1081 (1991) 167–173.
- [31] J.P. Pégrier, P.H. Duée, P. Clouet, C. Kohl, C. Herbin, J. Girard, Octanoate metabolism in isolated hepatocytes and mitochondria from fetal, newborn and adult rabbit. Evidence for a high capacity for octanoate esterification in term fetal liver, *Eur. J. Biochem. FEBS* 184 (1989) 681–686.
- [32] J.P. Pégrier, P.H. Duée, C. Herbin, P.Y. Lulan, C. Bladé, J. Peret, et al., Fatty acid metabolism in hepatocytes isolated from rats adapted to high-fat diets containing long- or medium-chain triacylglycerols, *Biochem. J.* 249 (1988) 801–806.
- [33] R.C. Johnson, S.K. Young, R. Cotter, L. Lin, W.B. Rowe, Medium-chain-triglyceride lipid emulsion: metabolism and tissue distribution, *Am. J. Clin. Nutr.* 52 (1990) 502–508.
- [34] E. Christensen, T.A. Hagve, M. Grønn, B.O. Christophersen, Beta-oxidation of medium chain (C8–C14) fatty acids studied in isolated liver cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1004 (1989) 187–195.
- [35] P. Sarda, G. Lepage, C.C. Roy, P. Chessex, Storage of medium-chain triglycerides in adipose tissue of orally fed infants, *Am. J. Clin. Nutr.* 45 (1987) 399–405.
- [36] J. Han, J.A. Hamilton, J.L. Kirkland, B.E. Corkey, W. Guo, Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats, *Obes. Res.* 11 (2003) 734–744.

- [37] A. Geliebter, N. Torbay, E.F. Bracco, S.A. Hashim, T.B. Van Itallie, Overfeeding with medium-chain triglyceride diet results in diminished deposition of fat, *Am. J. Clin. Nutr.* 37 (1983) 1–4.
- [38] N. Baba, E.F. Bracco, S.A. Hashim, Role of brown adipose tissue in thermogenesis induced by overfeeding a diet containing medium chain triglyceride, *Lipids* 22 (1987) 442–444.
- [39] G. Crozier, B. Bois-Joyeux, M. Chanez, J. Girard, J. Peret, Metabolic effects induced by long-term feeding of medium-chain triglycerides in the rat, *Metabolism* 36 (1987) 807–814.
- [40] H. Tsuji, M. Kasai, H. Takeuchi, M. Nakamura, M. Okazaki, K. Kondo, Dietary medium-chain triacylglycerols suppress accumulation of body fat in a double-blind, controlled trial in healthy men and women, *J. Nutr.* 131 (2001) 2853–2859.
- [41] M.P. St-Onge, P.J. Jones, Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity, *J. Nutr.* 132 (2002) 329–332.
- [42] M.P. St-Onge, A. Bosarge, L.L. Goree, B. Darnell, Medium chain triglyceride oil consumption as part of a weight loss diet does not lead to an adverse metabolic profile when compared to olive oil, *J. Am. Coll. Nutr.* 27 (2008) 547–552.
- [43] F. Labarthe, R. Gélinas, C. Des Rosiers, Medium-chain fatty acids as metabolic therapy in cardiac disease, *Cardiovasc. Drugs Ther. Spont. Int. Soc. Cardiovasc. Pharmacother.* 22 (2008) 97–106, <http://dx.doi.org/10.1007/s10557-008-6084-0>.
- [44] L. Ferreira, K. Lisenko, B. Barros, M. Zangeronimo, L. Pereira, R. Sousa, Influence of medium-chain triglycerides on consumption and weight gain in rats: a systematic review, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98 (2014) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12030>.
- [45] S. Tachibana, K. Sato, Y. Cho, T. Chiba, W.J. Schneider, Y. Akiba, Octanoate reduces very low-density lipoprotein secretion by decreasing the synthesis of apolipoprotein B in primary cultures of chicken hepatocytes, *Biochim. Biophys. Acta* 1737 (2005) 36–43.
- [46] S.A. Hashim, A. Arteaga, T.B. Van Itallie, Effect of a saturated medium-chain triglyceride on serum-lipids in man, *Lancet* 1 (1960) 1105–1108.
- [47] G.M. Wardlaw, J.T. Snook, S. Park, P.K. Patel, F.C. Pendley, M.S. Lee, et al., Relative effects on serum lipids and apolipoproteins of a caprenin-rich diet compared with diets rich in palm oil/palm-kernel oil or butter, *Am. J. Clin. Nutr.* 61 (1995) 535–542.
- [48] D.M. Hegsted, R.B. McGandy, M.L. Myers, F.J. Stare, Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man, *Am. J. Clin. Nutr.* 17 (1965) 281–295.
- [49] E.H. Temme, R.P. Mensink, G. Hornstra, Effects of medium chain fatty acids (MCHA), myristic acid, and oleic acid on serum lipoproteins in healthy subjects, *J. Lipid Res.* 38 (1997) 1746–1754.
- [50] R.B. McGandy, D.M. Hegsted, M.L. Myers, Use of semisynthetic fats in determining effects of specific dietary fatty acids on serum lipids in man, *Am. J. Clin. Nutr.* 23 (1970) 1288–1298.
- [51] L.L. Swift, J.O. Hill, J.C. Peters, H.L. Greene, Plasma lipids and lipoproteins during 6 d of maintenance feeding with long-chain, medium-chain, and mixed-chain triglycerides, *Am. J. Clin. Nutr.* 56 (1992) 881–886.
- [52] N.B. Cater, H.J. Heller, M.A. Denke, Comparison of the effects of medium-chain triacylglycerols, palm oil, and high oleic acid sunflower oil on plasma triacylglycerol fatty acids and lipid and lipoprotein concentrations in humans, *Am. J. Clin. Nutr.* 65 (1997) 41–45.
- [53] T. Tholstrup, C. Ehnholm, M. Jauhainen, M. Petersen, C.-E. Høy, P. Lund, et al., Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 564–569.
- [54] D.B. van Schalkwijk, W.J. Pasman, H.F.J. Hendriks, E.R. Verheij, C.M. Rubingh, K. van Bochove, et al., Dietary medium chain fatty acid supplementation leads to reduced VLDL lipolysis and uptake rates in comparison to linoleic acid supplementation, *PLoS One* 9 (2014) e100376, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100376>.
- [55] F.B. Hu, M.J. Stampfer, J.E. Manson, A. Ascherio, G.A. Colditz, F.E. Speizer, et al., Dietary saturated fats and their food sources in relation to the risk of coronary heart disease in women, *Am. J. Clin. Nutr.* 70 (1999) 1001–1008.
- [56] A. Astrup, J. Dyerberg, P. Elwood, K. Hermansen, F.B. Hu, M.U. Jakobsen, et al., The role of reducing intakes of saturated fat in the prevention of cardiovascular disease: where does the evidence stand in 2010? *Am. J. Clin. Nutr.* 93 (2011) 684–688.
- [57] P. Legrand, V. Rioux, The complex and important cellular and metabolic functions of saturated fatty acids, *Lipids* 45 (2010) 941–946.
- [58] P. Legrand, E. Beauchamp, D. Catheline, F. Pedrono, V. Rioux, Short chain saturated fatty acids decrease circulating cholesterol and increase tissue PUFA content in the rat, *Lipids* 45 (2010) 975–986.
- [59] Q. Du, J.-C. Martin, G. Agnani, N. Pages, P. Leruyet, P. Carayon, et al., Dairy fat blends high in α -linolenic acid are superior to n-3 fatty-acid-enriched palm oil blends for increasing DHA levels in the brains of young rats, *J. Nutr. Biochem.* 23 (2012) 1573–1582, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.10.011>.
- [60] B. Delplanque, Q. Du, G. Agnani, P. Le Ruyet, J.C. Martin, A dairy fat matrix providing alpha-linolenic acid (ALA) is better than a vegetable fat mixture to increase brain DHA accretion in young rats, *Prostagl. Leukot. Essent. Fat. Acids* 88 (2013) 115–120.
- [61] T. Priego, J. Sanchez, A.P. Garcia, A. Palou, C. Pico, Maternal dietary fat affects milk fatty acid profile and impacts on weight gain and thermogenic capacity of suckling rats, *Lipids* 48 (2013) 481–495.
- [62] S.C. Cunnane, M.J. Anderson, The majority of dietary linoleate in growing rats is beta-oxidized or stored in visceral fat, *J. Nutr.* 127 (1997) 146–152.
- [63] H. Ezanno, E. Beauchamp, D. Catheline, P. Legrand, V. Rioux, Beneficial impact of a mix of dairy fat with rapeseed oil on n-6 and n-3 PUFA metabolism in the rat: a small enrichment in dietary alpha-linolenic acid greatly increases its conversion to DHA in the liver, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117 (2015) 281–290, <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201400304>.
- [64] J.J. Kabara, D.M. Swieczkowski, A.J. Conley, J.P. Truant, Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents, *Antimicrob. Agents Chemother.* 2 (1972) 23–28.
- [65] A.P. Desbois, V.J. Smith, Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (2010) 1629–1642, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>.
- [66] C.E. Isaacs, K.S. Kim, H. Thormar, Inactivation of enveloped viruses in human bodily fluids by purified lipids, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 724 (1994) 457–464.
- [67] H. Galbraith, T.B. Miller, A.M. Paton, J.K. Thompson, Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol, *J. Appl. Bacteriol.* 34 (1971) 803–813, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1971.tb01019.x>.
- [68] H. Thormar, C.E. Isaacs, H.R. Brown, M.R. Barshatzky, T. Pessolano, Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 (1987) 27–31, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.31.1.27>.
- [69] C.J. McGrattan, J.D. Sullivan, M. Ikawa, Inhibition of chlorella (chlorophyceae) growth by fatty acids, using the paper disc method 1, 2, *J. Phycol.* 12 (1976) 129–131, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.1976.tb02839.x>.
- [70] F. Dohme, A. Machmüller, A. Wasserfallen, M. Kreuzer, Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets, *Lett. Appl. Microbiol.* 32 (2001) 47–51.
- [71] D.A. Towler, J.I. Gordon, S.P. Adams, L. Glaser, The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation, *Annu. Rev. Biochem.* 57 (1988) 69–99.
- [72] S. Blaskovic, A. Adibekian, M. Blanc, G.F. van der Goot, Mechanistic effects of protein palmitoylation and the cellular consequences thereof, *Chem. Phys. Lipids* 180 (2014) 44–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2014.02.001>.
- [73] D.R. Johnson, R.S. Bhatnagar, L.J. Knoll, J.I. Gordon, Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 869–914.
- [74] H. Ezanno, E. Beauchamp, F. Lemarié, P. Legrand, V. Rioux, L'acylation des protéines: une fonction cellulaire importante des acides gras saturés, *Nutr. Clin. Metab.* 27 (2013) 10–19.
- [75] A.D. Howard, S.D. Feighner, D.F. Cully, J.P. Arena, P.A. Liberato, C.I. Rosenblum, et al., A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release, *Science* 273 (1996) 974–977.
- [76] C. Delporte, Structure and physiological actions of ghrelin, *Scientifica* 2013 (2013) 518909, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/518909>.
- [77] M.S. Taylor, T.R. Ruch, P.-Y. Hsiao, Y. Hwang, P. Zhang, L. Dai, et al., Architectural organization of the metabolic regulatory enzyme ghrelin O-acyltransferase, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 32211–32228, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.510313>.
- [78] C.T. Lim, B. Kola, A. Grossman, M. Korbonits, The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues, *Endocr. J.* 58 (2011) 707–710.
- [79] J.E. Darling, F. Zhao, R.J. Loftus, L.M. Patton, R.A. Gibbs, J.L. Hougland, Structure–activity analysis of human ghrelin O-acyltransferase reveals chemical determinants of ghrelin selectivity and Acyl group recognition, *Biochem. (Mosc.)* 54 (2015) 1100–1110, <http://dx.doi.org/10.1021/bi5010359>.
- [80] M.S. Taylor, Y. Hwang, P.-Y. Hsiao, J.D. Boeke, P.A. Cole, Ghrelin O-acyltransferase assays and inhibition, *Methods Enzymol.* 514 (2012) 205–228, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381272-8.00013-1>.
- [81] J.V. Zhang, P.-G. Ren, O. Avsian-Kretschmer, C.-W. Luo, R. Rauch, C. Klein, et al., Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake, *Science* 310 (2005) 996–999, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1117255>.
- [82] P.J. Delhanty, S.J. Neggers, A.J. van der Lely, Des-acyl ghrelin: a metabolically active peptide, *Endocr. Dev.* 25 (2013) 112–121, <http://dx.doi.org/10.1159/000346059>.
- [83] S. Janssen, J. Laermans, H. Iwakura, J. Tack, I. Depoortere, Sensing of fatty acids for octanoylation of ghrelin involves a gustatory G-protein, *PLoS One* 7 (2012) e40168, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0040168>.
- [84] S. Janssen, I. Depoortere, Nutrient sensing in the gut: new roads to therapeutics? *Trends Endocrinol. Metab.* 24 (2013) 92–100.
- [85] D. Moechars, I. Depoortere, B. Moreaux, B. de Smet, I. Goris, L. Hoskens, et al., Altered gastrointestinal and metabolic function in the GPR39-obestatin receptor–knockout mouse, *Gastroenterology* 131 (2006) 1131–1141, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2006.07.009>.
- [86] N. Chartrel, R. Alvear-Perez, J. Leprieux, X. Iturriz, A.R.-L. Goazigo, V. Audinot, et al., Comment on “Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake,” *Science* 315 (2007) <http://dx.doi.org/10.1126/science.1135047>, 766–766.
- [87] B. Holst, K.L. Egerod, E. Schild, S.P. Vickers, S. Cheetham, L.-O. Gerlach, et al., GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin, *Endocrinology* 148 (2007) 13–20, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-0933>.
- [88] A. Van Dijk, V.D. Annemie, D. Van Dam, V.D. Debby, V. Vergote, V. Valentijn, et al., Central administration of obestatin fails to show inhibitory effects on

- food and water intake in mice, *Regul. Pept.* 156 (2009) 77–82, <http://dx.doi.org/10.1016/j.regpep.2009.04.014>.
- [89] R. Hassouna, P. Zizzari, O. Viltart, S.-K. Yang, R. Gardette, C. Videau, et al., A natural variant of obestatin, Q90L, inhibits ghrelin's action on food intake and GH secretion and targets NPY and GHRH neurons in mice, *PLoS One* 7 (2012) e51135, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051135>.
- [90] P. Zizzari, R. Longchamps, J. Epelbaum, M.T. Bluet-Pajot, Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents, *Endocrinology* 148 (2007) 1648–1653, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2006-1231>.
- [91] Y. Nishi, H. Hiejima, H. Hosoda, H. Kaiya, K. Mori, Y. Fukue, et al., Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin, *Endocrinology* 146 (2005) 2255–2264.
- [92] Y. Nishi, H. Mifune, A. Yabuki, Y. Tajiri, R. Hirata, E. Tanaka, et al., Changes in subcellular distribution of n-octanoyl or n-decanoyl ghrelin in ghrelin-producing cells, *Front. Endocrinol.* 4 (2013) 84, <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2013.00084>.
- [93] D.E. Cummings, J.Q. Purnell, R.S. Frayo, K. Schmidova, B.E. Wisse, D.S. Weigle, A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans, *Diabetes* 50 (2001) 1714–1719.
- [94] F. Lemarié, E. Beauchamp, S. Dayot, C. Duby, P. Legrand, V. Rioux, Dietary caprylic acid (C8:0) does not increase plasma acylated ghrelin but decreases plasma unacylated ghrelin in the rat, *PLoS One* 10 (2015) e0133600, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0133600>.
- [95] B.P. Barnett, Y. Hwang, M.S. Taylor, H. Kirchner, P.T. Pfluger, V. Bernard, et al., Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-acyltransferase inhibitor, *Science* 330 (2010) 1689–1692.
- [96] Z. Gong, M. Yoshimura, S. Aizawa, R. Kurotani, J.M. Zigman, T. Sakai, et al., G protein-coupled receptor 120 signaling regulates ghrelin secretion in vivo and in vitro, *Am. J. Physiol. – Endocrinol. Metab.* 306 (2014) E28–E35, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00306.2013>.
- [97] W. Chen, P.J. Enriori, Ghrelin: a journey from GH secretagogue to regulator of metabolism, *Transl. Gastrointest. Cancer* 4 (2014) 14–27.
- [98] K. Takagi, R. Legrand, A. Asakawa, H. Amitani, M. François, N. Tenoune, et al., Anti-ghrelin immunoglobulins modulate ghrelin stability and its orexigenic effect in obese mice and humans, *Nat. Commun.* 4 (2013), <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3685>.
- [99] M. Goebel-Stengel, T. Hofmann, U. Elbelt, P. Teuffel, A. Ahnis, P. Kobelt, et al., The ghrelin activating enzyme ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) is present in human plasma and expressed dependent on body mass index, *Peptides* 43 (2013) 13–19, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2013.02.011>.
- [100] Y. Nishi, H. Hiejima, H. Mifune, T. Sato, K. Kangawa, M. Kojima, Developmental changes in the pattern of ghrelin's acyl modification and the levels of acyl-modified ghrelins in murine stomach, *Endocrinology* 146 (2005) 2709–2715, <http://dx.doi.org/10.1210/en.2004-0645>.
- [101] R. Fukumori, T. Sugino, H. Shingu, N. Moriya, H. Kobayashi, Y. Hasegawa, et al., Ingestion of medium chain fatty acids by lactating dairy cows increases concentrations of plasma ghrelin, *Domest. Anim. Endocrinol.* 45 (2013) 216–223, <http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2013.09.005>.
- [102] J.-I. Ashitani, N. Matsumoto, M. Nakazato, Effect of octanoic acid-rich formula on plasma ghrelin levels in cachectic patients with chronic respiratory disease, *Nutr. J.* 8 (2009) 25, <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-8-25>.
- [103] Y. Nishi, H. Mifune, M. Kojima, Ghrelin acylation by ingestion of medium-chain fatty acids, *Methods Enzymol.* 514 (2012) 303–315, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381272-8.00019-2>.
- [104] M. Patterson, K.G. Murphy, C.W. le Roux, M.A. Ghatgei, S.R. Bloom, Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 2205–2211, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2004-1641>.
- [105] P.J.D. Delhanty, M. Huisman, M. Julien, K. Mouchain, P. Brune, A.P.N. Themmen, et al., The acylated (AG) to unacylated (UAG) ghrelin ratio in esterase inhibitor-treated blood is higher than previously described, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 82 (2015) 142–146, <http://dx.doi.org/10.1111/cen.12489>.
- [106] J. Kamegai, H. Tamura, T. Shimizu, S. Ishii, H. Sugihara, I. Wakabayashi, Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats, *Diabetes* 50 (2001) 2438–2443.
- [107] M. Tschöp, D.L. Smiley, M.L. Heiman, Ghrelin induces adiposity in rodents, *Nature* 407 (2000) 908–913, <http://dx.doi.org/10.1038/35038090>.
- [108] R.G. Albarran-Zeckler, Y. Sun, R.G. Smith, Physiological roles revealed by ghrelin and ghrelin receptor deficient mice, *Peptides* 32 (2011) 2229–2235, <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2011.07.003>.
- [109] H. Kirchner, J.A. Gutierrez, P.J. Solenberg, P.T. Pfluger, T.A. Czyzyk, J.A. Willency, et al., GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance, *Nat. Med.* 15 (2009) 741–745.
- [110] C.-X. Yi, K.M. Heppner, H. Kirchner, J. Tong, M. Bielohuby, B.D. Gaylenn, et al., The GOAT-ghrelin system is not essential for hypoglycemia prevention during prolonged calorie restriction, *PLoS One* 7 (2012) e32100, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032100>.
- [111] P. Legrand, V. Rioux, Specific roles of saturated fatty acids: beyond epidemiological data, in press, *Eur. J. Lipid Sci. Technol* (2015), <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.201400514>.

RÉSUMÉ

Impact de l'acide octanoïque alimentaire sur l'octanoylation de la Ghréline, chez le rat

Les acides gras saturés à chaîne moyenne (AGCM) ont été décrits comme potentiellement bénéfiques pour réguler la balance énergétique chez l'homme. Cependant, la récente découverte de l'activation de la ghréline, hormone gastrique orexigène, par l'acide octanoïque (C8:0), ajoute un nouveau niveau de complexité dans la compréhension des effets physiologiques des AGCM. En effet, pour être reconnue par son récepteur hypophysaire, la ghréline doit préalablement être octanoylée par la Ghréline O-Acyltransférase (GOAT). Or, les paramètres régulés par la ghréline ainsi modifiée s'opposent aux effets connus des AGCM, en favorisant la prise alimentaire et la prise de masse. L'élaboration d'inhibiteurs de la GOAT constitue donc une stratégie thérapeutique nouvelle pour lutter contre l'obésité. Les AGCM sont essentiellement apportés par l'alimentation, leur biosynthèse endogène n'ayant été décrite que dans les cellules de la glande mammaire en lactation. Etudier l'impact du C8:0 d'origine alimentaire sur l'octanoylation de la ghréline est donc d'autant plus pertinent, car celui-ci est suspecté de fournir à la GOAT le co-substrat nécessaire à l'octanoylation. Afin de mieux comprendre l'apparente contradiction entre les effets connus des AGCM sur la masse corporelle et la satiété, et l'effet de l'octanoylation de la ghréline, quatre approches ont été mises en œuvre: (1) Etude des effets physiologiques du C8:0 à différentes doses sur l'axe ghréline-GOAT et sur le métabolisme chez le rat adulte, (2) Etude de l'absorption gastrique du C8:0 par inhibition de la lipase préduodénale, chez le raton, (3) Etude du métabolisme du C8:0 dans les cellules gastriques *in vitro*, (4) Etude de l'activité de la GOAT *in vitro*.

Mots-clés : acide gras saturé à chaîne moyenne ; ghréline ; octanoylation ; acylation ; ghréline O-acyltransférase ; lipase préduodénale ; absorption gastrique

ABSTRACT

Impact of dietary octanoic acid on Ghrelin octanoylation, in the rat

Medium chain fatty acids (MCFA) have been described as potentially beneficial for regulating human energetic balance. However, the recent discovery of the orexigenic ghrelin activation by octanoic acid revealed a new level of complexity in MCFA effects. Ghrelin must be octanoylated by the Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT) to bind its pituitary receptor. Interestingly, the effects mediated by the post-translationally modified ghrelin seem opposed to MCFA known effects, increasing food intake and body weight. Development of GOAT inhibitors could then constitute a therapeutic strategy against obesity. MCFA are mainly provided by the diet, as their endogenous synthesis has only been described in lactating mammary glands. Dietary caprylic acid is then suspected to provide the GOAT enzyme with octanoyl- CoA co-substrates necessary for the acyl modification of ghrelin. My objective is to understand the discrepancy between the formerly described beneficial effects of dietary MCFAs on body weight loss and the C8:0 newly reported effect on appetite stimulation via ghrelin octanoylation. This thesis is divided into four parts: (1) Study of C8:0 physiological effects on ghrelin-GOAT axis, in rat, (2) Study of C8:0 gastric absorption by inhibition of preduodenal lipase, in young rat, (3) Study of C8:0 metabolism in gastric cells *in vitro*, (4) Preliminary study of GOAT activity *in vitro*.

Keywords: Medium chain fatty acid; ghrelin; octanoylation; acylation; ghrelin O-acyltransferase; preduodenal lipase; gastric absorption



AGROCAMPUS OUEST • Institut supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc - CS84215 - F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr

