



Consommation d'édulcorants intenses non-caloriques et santé cardiométabolique : effets sur le contrôle glycémique et la fonction vasculaire chez le rongeur

Sydney Risdon

► To cite this version:

Sydney Risdon. Consommation d'édulcorants intenses non-caloriques et santé cardiométabolique : effets sur le contrôle glycémique et la fonction vasculaire chez le rongeur. Médecine humaine et pathologie. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT : 2021AVIG0719 . tel-03227834

HAL Id: tel-03227834

<https://theses.hal.science/tel-03227834>

Submitted on 17 May 2021

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.



THÈSE DE DOCTORAT D'AVIGNON UNIVERSITÉ

École Doctorale N° 536
Agrosciences et Sciences

Spécialité / Discipline de doctorat :
Physiologie

Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire

Présentée par
Sydney Risdon

Consommation d'édulcorants intenses non-caloriques et santé cardiométabolique : effets sur le contrôle glycémique et la fonction vasculaire chez le rongeur

***Intense artificial sweeteners consumption and
cardiometabolic health: effect on glycemic control and
vascular function in rodents.***

Soutenue publiquement le **16 mars 2021** devant le jury composé de :

Mme Christine MORAND
M. Jean-François LANDRIER
Mme Dominique SIGAUDO-ROUSSEL
Mme Havovi CHICHGER
M. Matthieu ROUSTIT
M. Grégory MEYER
M. Guillaume WALTHER

DR, INRAE, Université Clermont Auvergne
DR, INRAE, Aix-Marseille Université
DR, CNRS, Université Lyon 1
Senior Lecturer, ARU, Cambridge Cardiovascular
PU-PH, INSERM, Université Grenoble Alpes
MCU, Avignon Université
MCU-HDR, Avignon Université

Rapportrice
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Examineur
Co-encadrant de thèse
Directeur de thèse

Remerciements

*Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire (LaPEC) d'Avignon Université sous la direction de **Guillaume Walther** et **Grégory Meyer**, que je tiens tout d'abord à remercier pour l'accompagnement durant ces trois dernières années. Un grand merci à **Sylvain Battault** pour ton aide précieuse tout au long de cette thèse, ton regard avisé, tes compétences et tes nombreux conseils m'ont permis de m'améliorer chaque jour.*

*Merci à la directrice du laboratoire, le Pr **Agnès Vinet** de m'avoir accueilli au sein de l'équipe et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.*

*Merci au Dr **Christine Morand** et le Dr **Jean-François Landrier** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. C'est un immense privilège pour moi de pouvoir compter sur votre expertise et votre complémentarité afin d'avoir un retour constructif sur mes différents travaux.*

Merci aux Dr Dominique Sigaud-Roussel, Dr Havovi Chichger et au Pr Matthieu Roustit de me faire l'honneur d'être examinateurs de cette thèse. Ce sera un réel plaisir pour moi d'échanger avec vous.

Merci à l'équipe du Dr Pascal de Santa Barbara (PhyMedExp INSERM Montpellier) et au laboratoire C2VN (Marseille) pour leur collaboration durant cette thèse.

Financements et collaborations

Comme évoqué dans les remerciements, ces travaux de thèse ont été réalisés au sein du Laboratoire de Pharm Ecologie Cardiovasculaire (LaPEC, EA4278) d'Avignon Université. Un financement a été attribué par la région afin de permettre la réalisation des travaux présentés dans le document.



Notre équipe a également bénéficié d'un financement local par Avignon Université (Projet Excellence 2018) et d'un financement national par l'Agence Nationale de la Recherche (AAPG ANR 2019) pour le projet « SOSweet » porté par le Docteur Guillaume Walther.



Une partie du matériel utilisé durant cette thèse appartenait à la plateforme 3A financé par le Fond de Développement Régional Européen, le Ministère de l'Enseignement Supérieure de la Recherche, la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur, le Conseil Départemental du Vaucluse ainsi que la communauté d'agglomération du grand Avignon.



Publications dans des revues scientifiques internationales

- [Risdon, S.](#), Roustit, M., Meyer, G., & Walther, G. (2019).
Is fasting blood glucose a reliable parameter to investigate the effect of non-nutritive sweeteners on glucose metabolism? European journal of clinical nutrition, 73(2), 331.
- [Risdon, S.](#), Meyer, G., Marziou, A., Riva, C., Roustit, M., & Walther, G. (2020).
Artificial sweeteners impair endothelial vascular reactivity: preliminary results in rodents, Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases – 30(5), 843-846.
- [Risdon, S.](#), Battault, S., Romo-romo, A., Roustit, M., Brian, L., Meyer, G., Almeda-Valdes, P., & Walther, G. (2021).
Sucralose and cardiometabolic health: current understanding from receptors to clinical investigations, Advances in Nutrition. (In press).
- Bolea, G., Philouze, C., Dubois, M., [Risdon, S.](#), Humberclaude, A., Ginies, C., ... & Meyer, G. (2021).
Digestive n-6 Lipid Oxidation, a Key Trigger of Vascular Dysfunction and Atherosclerosis in the Western Diet: Protective Effects of Apple Polyphenols. Molecular Nutrition & Food Research, 2000487.

Publications en cours de préparation

- [Risdon, S.](#), Battault, S., Paillargue, M., Gayrard, S., Santa-Barbara, P., Reboul, C., Meyer, G., & Walther, G.
Effect of chronic sucralose consumption on glucose metabolism and vascular function in obese-induced mice. (Manuscrit en préparation).

Communications dans des congrès nationaux et internationaux

- [Risdon S.](#), **MidiSciences**, Avignon Université,
« Les édulcorants dans l'alimentation. Une vraie douceur pour la santé ? ». (2020)
- [Risdon S.](#), **Conférence à la prison de Arles**
« Nutrition et santé les clés pour un métabolisme plus sain ». (2020)

- **Risdon, S., Meilleurs poster en 90 secondes (JFN 2019)**
« Impact d'une consommation chronique d'un édulcorant intense sur la composition corporelle, le métabolisme du glucose et la fonction vasculaire chez la souris obèse C57bl6/J ». (2020)
- **Risdon, S., Paillargue, M., Meyer, G., & Walther, G.**
Non-nutritive sweetener sucralose chronic consumption is able to reduce the deleterious effect of high-fat diet on body composition, glucose metabolism and vascular function in C57BL/6JR mice, Archives of Cardiovascular Diseases Supplements, 12(2-4), 208. (2020)

Communications affichées dans des congrès nationaux

- **Risdon, S., Boyer, M., Ruff, E., El Dirani, Z., Brasseur, S., Gonthier, B. & Faury, G. (2018).**
Impact of ageing on the deleterious effects caused to the large arteries by intermittent hypoxia in mice. Archives of Cardiovascular Diseases Supplements, 10(2), 247.
- **Risdon, S., Strock, E., Meyer, G., Marziou, A., Gayrard, S., Riva, C., & Walther, G. (2019).**
Chronic non-nutritive sweeteners consumption alters lipid metabolism, body composition and arterial vasomotor function: Preliminary data in a healthy rat population. Archives of Cardiovascular Diseases Supplements, 11(2), 199-200.
- **Risdon, S., Paillargue, M., Meyer, G., & Walther, G. (2019)**
Non-nutritive sweetener sucralose chronic consumption is able to reduce the deleterious effect of high-fat diet on body composition, glucose metabolism and vascular function in C57BL/6JR mice, Archives of Cardiovascular Diseases Supplements, 12(2-4), 208.
- **Strock, E., Risdon, S., Mattia, E., Revol, C., Battault, S., Gayrard, S. & Meyer, G. (2018).**
Involvement of sodium-glucose cotransporters in the deleterious effects of acute hyperglycemia on vascular function: Implication of oxidative stress. Archives of Cardiovascular Diseases Supplements, 10(2), 231.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	1
REVUE DE LITTERATURE.....	5
1. Sucre ou édulcorant : le dilemme de l'alimentation contemporaine	6
<i>a. Les agents du goût sucré</i>	<i>6</i>
<i>i. Le sucre</i>	<i>6</i>
<i>ii. Les édulcorants</i>	<i>7</i>
Le sucralose	10
L'acésulfame de potassium	11
<i>b. La perception du goût : structures de détection</i>	<i>12</i>
<i>i. Les récepteurs au goût sucré</i>	<i>13</i>
<i>ii. Les récepteurs au goût amer</i>	<i>14</i>
<i>c. Signalisation associée à l'activation des récepteurs gustatifs</i>	<i>15</i>
<i>d. Mécanisme d'absorption et métabolisation cellulaire</i>	<i>17</i>
<i>i. Les glucides.....</i>	<i>17</i>
Le glucose, principal substrat énergétique cellulaire.....	18
Le rôle de l'insuline.....	18
Le rôle des incrétines.....	21
Le rôle de la leptine	22
<i>ii. Le sucralose et l'acésulfame de potassium</i>	<i>22</i>
2. Consommation de sucre ou d'édulcorant : conséquences sur la santé	
cardiométabolique.	26
<i>a. Données épidémiologiques</i>	<i>27</i>
<i>i. Consommation de sucre et mortalité cardiovasculaire.....</i>	<i>27</i>
<i>ii. Consommation d'édulcorants et mortalité cardiovasculaire.....</i>	<i>28</i>
<i>b. Sucre et réponses biologiques : rôle dans le développement de facteurs de risques</i>	
<i>cardiovasculaires.....</i>	<i>31</i>
<i>i. Complications métaboliques</i>	<i>31</i>
Surcharge pondérale et obésité	31

Inflammation et dyslipidémie	31
Leptino-résistance et sécrétion d'incrétine	32
Hyperinsulinémie et insulino-résistance	33
ii. Complications cardiovasculaires : atteintes de la fonction endothéliale vasculaire	34
Rappel de physiologie vasculaire	34
Hyperglycémie aiguë et dysfonction endothéliale	36
Perturbations métaboliques et dysfonction endothéliale	38
c. Rôle biologique des édulcorants dans le développement de facteurs de risque cardiovasculaire	39
i. Le sucralose	40
ii. L'acésulfame de potassium	55
Effet sur la masse corporelle	55
Effet sur le contrôle glycémique	56
Effet sur la fonction cardiovasculaire	58
iii. Le mélange sucralose et acésulfame de potassium	59
Effet sur la composition corporelle	59
Effet sur le contrôle glycémique	60
OBJECTIFS ET HYPOTHESES DU TRAVAIL DE THESE	64
MATERIELS ET METHODES	67
1. POPULATIONS	68
a. ETUDE N°1 : Effet de la consommation chronique d'un cocktail d'édulcorants sur la composition corporelle et la fonction vasculaire chez le rat sain	68
b. ETUDE N°2 : Caractérisation de la consommation chronique d'un édulcorant intense, effet de cette consommation sur la composition corporelle, le métabolisme du glucose et la fonction vasculaire de souris saines ou rendues obèses par un régime riche en graisses.	70
2. PARAMETRE BIOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE	73
a. Mesure de la pression artérielle chez la souris	73
b. Etude du contrôle de la glycémie chez le rat et la souris	74
i. Régulation de la glycémie	74
ii. Evaluation de l'insulino-résistance	74

3. ETUDE DE LA REACTIVITE VASCULAIRE AORTIQUE EX VIVO	75
a. <i>Protocole expérimental ETUDE N°1</i>	76
b. <i>Protocole expérimental ETUDE N°2</i>	77
4. ANALYSES HISTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES	77
a. <i>Dosage des protéines</i>.....	77
b. <i>Dosage des taux d'insuline sérique</i>	78
c. <i>Caractérisation du tissu adipeux épidydymal et inguinal par histologie</i>	78
d. <i>Evaluation du taux d'assimilation des lipides issus de fèces de souris</i>	79
5. ANALYSES STATISTIQUES.....	79
RESULTATS	80
ETUDE N°1	81
ETUDE N°2	86
ABSTRACT	88
INTRODUCTION	89
MATERIALS AND METHODS.....	91
<i>Animals and diets</i>	91
<i>Experimental protocol</i>	91
<i>Biochemical measurments</i>	91
<i>Fasting blood glucose, glucose and insulin tolerance test</i>	91
<i>Adipocyte histological analyses</i>	92
<i>Preparation of isolated thoracic aortic rings and vascular reactivity</i>	92
<i>Lipids absorption measurement</i>	92
<i>Spontaneous physical activity</i>	93
<i>Statistical analyses</i>	93
RESULTS	94
<i>Chronic sucralose consumption limits adipogenecity in induced-obese mice</i>	94
<i>Chronic sucralose consumption limits adipogenecity in induced-obese mice</i>	96
<i>Preservation of insulin pathway in HF mice with chronic sucralose consumption</i> .	97
<i>Alterations of vascular function in response to sucralose consumption</i>	99
DISCUSSION	101
<i>Sucralose consumption prevent body composition changes in high-fat diet:</i>	

<i>importance of the dose</i>	101
<i>Sucralose chronic consumption prevents glycemic control disruptions induced by high fat diet</i>	102
<i>Sucralose chronic consumption prevents cardiometabolic alterations induced by high fat diet</i>	103
CONCLUSION	105
RESULTATS ADDITIONNELS	111
a. Effet aigu de l'ingestion de sucralose sur la réponse métabolique à un test de tolérance au glucose 111	
Contexte et objectif	111
Matériels et méthodes	111
<i>Population et protocole expérimental</i>	111
<i>Procédure de test oral de tolérance au glucose</i>	111
<i>Analyses histologiques et biochimiques</i>	112
○ <i>Dosage de l'insuline sérique</i>	112
○ <i>Morphologie et capacité de sécrétion insulinaire des îlots β de Langerhans</i>	112
Résultats	113
b. Effet aigu de l'exposition vasculaire au sucralose ou à l'acésulfame sur la vasomotricité et la réponse adrénergique	115
Contexte et objectifs	115
Matériels et méthodes	115
<i>Populations expérimentales</i>	115
<i>Expression génique de TAS1R2 et TAS1R3 par Reverse Transcriptase-qPCR</i>	116
<i>Quantification protéique de TAS1R3 dans l'aorte de rongeur</i>	117
○ <i>Extraction et préparation des échantillons</i>	117
○ <i>Dosage des protéines</i>	117
○ <i>Western Immunoblotting</i>	117
<i>Etude de la réactivité vasculaire</i>	118
Résultats	120
<i>Le sucralose et l'acésulfame de potassium modulent, de façon spécifique selon la molécule, la fonction vasculaire</i>	120

<i>L'exposition à l'acésulfame de potassium, mais pas au sucralose, potentialise la réponse adrénergique vasculaire</i>	121
<i>Les récepteurs au goût sucré, sensibles à l'Ace-K et au sucralose, sont exprimés dans le tissu aortique de rongeurs</i>	122
<i>L'action du sucralose et de l'acésulfame de potassium sur la vasomotricité artérielle ne semble pas dépendre de l'activation des récepteurs vasculaires au goût sucré.....</i>	123
<i>Expression de la sous-unité TAS1R3 au niveau du tissu vasculaire humain et modulation de la vasomotricité par le sucralose et l'acésulfame de potassium</i>	124
DISCUSSION	126
<i>1. L'utilisation des édulcorants peut-elle être efficace dans la prévention du risque métabolique et cardiovasculaire ?</i>	127
<i>Le sucralose et l'acésulfame de potassium peuvent-ils impacter la balance vasomotrice ?</i>	127
<i>Quel rôle pour le sucralose et l'acésulfame de potassium dans la régulation du stockage énergétique ?</i>	130
<i>Quel rôle pour le sucralose et dans le contrôle de la glycémie ?</i>	132
<i>2. Importance du design expérimental dans l'évaluation des effets cardiométaboliques des édulcorants</i>	133
<i>Spécificité de chaque molécule.....</i>	133
<i>Application d'un stress</i>	133
<i>Une relation effet dose</i>	134
CONCLUSION	136
PERSPECTIVES	137
BIBLIOGRAPHIE	138
ANNEXES	154
RESUME	157

Liste des abréviations

Ace-K : acesulfame de potassium

ACh : acétylcholine

AGEs : advances glycation end products

AS : artificial sweeteners

BCA : bicinchonidic acid

BSA : bovine serum albumin

CMLV : cellules musculaires lisses
vasculaires

CV : cardiovasculaire

DJA : dose journalière admissible

DT2 : diabète de type 2

EROs : espèces réactives de l'oxygène

GLP-1 : glucagon-like peptide-1

HF : high fat

HG : hyperglycémie

KH : Krebs-Henseleit

NC : normal chow

NG : normoglycémique

NO : monoxyde d'azote

PE : phényléphrine

TAS1R2 : taste receptor type 1 member 2

TAS1R3 : taste receptor type 1 member 3

S : sucrose

Su : sucralose

W : water

NC : normal chow

Cellules-β : cellules β-pancréatiques

FDA : Food and Drug Administration

EFSA : European Food Safety Authority

ANSES : Agence Nationale de Sécurité
Sanitaire de l'alimentation, de
l'environnement et du travail

OGTT : Oral Glucose Tolerance Test

PBS : Phosphate Buffer Saline

Liste des figures et tableaux

1. Figures

<i>Figure 1 : Structure chimique des sucres présents dans l'alimentation</i>	<i>7</i>
<i>Figure 2 : Structure chimique du sucralose</i>	<i>11</i>
<i>Figure 3 : Structure chimique de l'acésulfame de potassium</i>	<i>11</i>
<i>Figure 4 : Typologie de senseurs gustatifs localisés dans la papille gustative</i>	<i>13</i>
<i>Figure 5 : Structure du récepteur du goût sucré</i>	<i>14</i>
<i>Figure 6 : Structure du récepteur au goût amer</i>	<i>15</i>
<i>Figure 7 : Voie de signalisation activée après stimulation des récepteurs au goût sucré et amer.....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 8 : Classification des glucides</i>	<i>17</i>
<i>Figure 9 : Cascade de signalisation médiée par la fixation de l'insuline sur son récepteur dans la cellule musculaire et adipeuse. PI₃K : phosphatidyl inositol-3-kinase ; IRS : Insulin Receptor Substrate ; Shc : Src Homologous and Collagen protein ; PKB : Protéine Kinase B; MAP-K : Mitogen activated protein.</i>	<i>19</i>
<i>Figure 10 : Utilisation du glucose dans la production d'ATP des cellules de tissus insulino-dépendants.</i>	<i>20</i>
<i>Figure 11 : Boucle de régulation de la glycémie par l'insuline</i>	<i>21</i>
<i>Figure 12 : Devenir du sucralose et de l'acésulfame de potassium après ingestion.</i>	<i>23</i>
<i>Figure 13 : Répartition corporelle des récepteurs au goût sucré et chez l'Homme.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 14 : Agents sucrants et leur différents récepteurs et cascade métabolique associées.</i>	<i>25</i>
<i>Figure 15 : Représentation de la présence de sucres libres et/ou totaux dans un produit de l'alimentation générale.</i>	<i>26</i>
<i>Figure 16 : Bilan des données épidémiologiques disponibles sur les effets de la consommation de boissons sucrées ou édulcorées sur le risque de mortalité totale et cardiovasculaire.</i>	<i>30</i>
<i>Figure 17 : Effet de la régulation de l'insuline sur ses différents tissus cibles en conditions physiologiques et pathologiques. AG : Acide gras libres</i>	<i>34</i>
<i>Figure 18 : Les différentes structures de la paroi vasculaire artérielle.....</i>	<i>35</i>
<i>Figure 19 : Effet de la consommation aiguë de boisson sucrée sur la fonction vasculaire. Reproduit de Loader et al., 2017. EROs : Espèces réactives de l'oxygène ; AGEs : Advanced Glycation Products ; NO : Nitric Oxide</i>	<i>37</i>
<i>Figure 20 : Consommation de sucres libres et/ou d'édulcorants intenses et survenue de complications cardiovasculaires</i>	<i>63</i>

<i>Figure 21 : Protocole expérimental de l'ETUDE N°1</i>	<i>69</i>
<i>Figure 22 : Protocole expérimental 1 de l'ETUDE N°2</i>	<i>71</i>
<i>Figure 23 : Protocole expérimental 2 de l'ETUDE N°2</i>	<i>72</i>
<i>Figure 24 : Mesure de la pression artérielle sur système CODA par méthode « Tail-cuff »</i>	<i>73</i>
<i>Figure 25 : Fonctionnement du système de mesure de la réactivité vasculaire schématique d'une cuve à organe isolé et de son fonctionnement.</i>	<i>76</i>
<i>Figure 26 : Protocole expérimental et évaluation de la tolérance au glucose chez la souris après une consommation aiguë de sucralose. Comme présenté dans le descriptif du protocole expérimental (A), la glycémie à jeun a été évaluée avant et après la procédure de gavage (B). Un test oral de tolérance au glucose (OGTT) (C) ainsi que la mesure de l'aire sous la courbe associée (D) ont été effectués dans nos deux groupes. Ces mesures ont été complétées par l'étude de la sécrétion d'insuline dépendante des cellules bêta pancréatiques évaluée par technique d'immunohistochimie (E) ainsi que par l'évaluation de l'insulinémie mesurée 45 minutes après le début de l'OGTT (F). W réfère à eau, Su réfère à sucralose. * : $P < 0,05$ contre $t=0$ minute.....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 27 : schéma de l'épiploon (ou omentum) et photographie de sa vascularisation chez l'Homme. Adapté de Ferron et Charitansky, 2011.</i>	<i>116</i>
<i>Figure 28 : Photographies représentatives des différentes composantes du myographe DMT. a) Vision d'ensemble du dispositif, b) Chambre du myographe, c) Cuve avec montage d'un vaisseau, d) Zoom sur le montage du vaisseau avec apparition des fils de tungsten.</i>	<i>119</i>
<i>Figure 29 : Effet de l'exposition au sucralose et Ace-K sur la vasomotricité d'aortes de rat pourvues ou non d'endothélium. * : $P < 0,05$.....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 30 : Effet de 30 minutes d'exposition à l'Ace-K ou au sucralose sur la réponse adrénergique d'aorte de rat pourvue ou non d'endothélium vasculaire. * : $P < 0.05$ contre véhicule.....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 31 : Expression génique et présence des sous-unités fonctionnelles du récepteur au goût sucré dans le tissu aortique, stomacal ou duodénal de rongeur. L'expression génique et protéique des sous-unités composant le récepteur au goût sucré ont été évaluées par PCR quantitative (Reverse transcriptase-qPCR, $n=1$ par analyse) dans le tissu aortique, stomacal et duodénal de souris et par western blot ($n=2-3$ animaux/groupe) dans le tissu aortique de souris et de rats.</i>	<i>123</i>
<i>Figure 32 : implication de la sous-unité TAS1R3 dans la vasomotricité observée après exposition des tissus à l'Ace-K ou au sucralose</i>	<i>124</i>
<i>Figure 33 : Expression génique des sous unités fonctionnelles du récepteur au goût sucré et effet du sucralose et de l'Ace-K au sein du tissu vasculaire humain.</i>	<i>124</i>
<i>Figure 34 : Hypothèses des cibles métaboliques et vasculaires des édulcorants pouvant participer à la mortalité cardiovasculaire.....</i>	<i>126</i>

2. Tableaux

<i>Tableau 1 : Edulcorants intenses autorisés en Europe.</i>	9
<i>Tableau 2 : Composition des régimes de l'ETUDE N°1</i>	69
<i>Tableau 3 : Composition des régimes de l'ETUDE N°2</i>	71

INTRODUCTION GENERALE

La prévalence des maladies cardiométaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2 (DT2) représente l'un des plus grands problèmes de santé publique de l'ère moderne. En 2016, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a rapporté que 39% et 19% de la population adulte mondiale étaient considérés comme étant respectivement en situation de surpoids ou d'obésité (Lim et al., 2020). Parallèlement, l'incidence mondiale du diabète a presque quadruplée au cours des dernières décennies, passant de 108 millions de personnes dans le monde en 1980, à 463 millions de patients atteints en 2019 (Atlas 2019 de la Fédération Internationale de Diabète). Ce constat sur l'état de santé actuel des populations soulève un enjeu primordial de santé publique, puisque l'obésité et le DT2 sont tous deux des facteurs de risque indépendants des maladies cardiovasculaires (CV), première cause de mortalité dans le monde (Piché et al., 2020 ; Yusuf et al., 2020 ; Dagenais et al., 2020).

Bien que cette situation d'ampleur soit le résultat d'une interaction complexe, entre de nombreux facteurs liés aux habitudes de vie et à des facteurs socio-économiques, il est désormais bien accepté que le déséquilibre alimentaire, causé notamment par des apports caloriques plus importants que la dépense énergétique, constitue l'une des causes principales d'apparition de ces pathologies métaboliques et CV (Saklayen et al., 2018). En effet, la consommation de plus en plus importante de produits « ultras transformés », riches en graisses et en sucres dit « ajoutés », est connue pour impacter à long terme l'équilibre métabolique de l'organisme (Poti et al., 2017 ; Hasegawa et al., 2020). Ainsi, plusieurs études épidémiologiques confirment l'existence d'un lien fort entre la consommation de boissons sucrées, principales sources de sucres ajoutés, et le développement de complications métaboliques (Marriott et al., 2010 ; Arsenault et al., 2017 ; Malik et al., 2010 ; Ruanpeng et al., 2017). Par ailleurs, des études très récentes montrent également une augmentation du risque de mortalité totale et plus particulièrement CV chez les grands consommateurs de ces boissons (Malik et al., 2019 ; Mullee et al., 2019 ; Mossavar-Rahmani et al., 2019).

Par conséquent, de nombreuses sociétés savantes ont recommandé de réduire la consommation quotidienne de sucres ajoutés. L'industrie agro-alimentaire a alors introduit les édulcorants de synthèse dans les aliments et les boissons pour remplacer les sucres ajoutés à haute teneur calorique (Gardner et al., 2012). Effectivement, certains édulcorants possèdent un caractère non-calorique et peu métabolisable, permettant potentiellement de minimiser les perturbations métaboliques (Sylvetsky et al., 2016 ; Tucker et Tan, 2017 ; Glendinning et al., 2019). Parmi les agents édulcorants, le sucralose est aujourd'hui la molécule la plus utilisée dans le monde (Business Wire, 2016 ; OQALI, 2019). Celle-ci est fréquemment utilisée, notamment dans les boissons dites sans sucres ou « *light* », seule ou en association avec d'autres édulcorants, tel que l'acésulfame de potassium (Ace-K) (Hackett et al., 2014). Nonobstant, bien que l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA)

et la Food and Drug Administration (FDA, Etats-Unis), aient approuvé l'innocuité de ces édulcorants pour la consommation humaine, il existe un nombre croissant de données contradictoires issues d'études animales ou cliniques. Ces études questionnent notamment la neutralité biologique et physiologique de ces molécules sur le contrôle glycémique (Pepino, 2015 ; Tucker and Tan, 2017 ; Romo-romo et al., 2018). L'hypothèse selon laquelle la consommation d'édulcorant puisse avoir un impact négatif sur la santé humaine a même été avancée récemment par l'EFSA et l'American Diabetes Association, qui demandent une réévaluation approfondie de la sécurité de ces additifs alimentaires (rapport attendu en 2021 pour l'EFSA). Ces réévaluations s'appuient notamment sur plusieurs études récentes. Elles démontrent, montrant, qu'au-delà des potentiels effets métaboliques, une augmentation significative de l'incidence des maladies CV et de la mortalité CV sont associées à la seule consommation de boissons édulcorées (Mullee et al., 2019 ; Mossavar-Rahmani et al., 2019).

Au vu de l'importance croissante de la consommation et de la présence des édulcorants dans l'alimentation, notamment dans les boissons sans sucres, l'association entre la consommation d'édulcorants et la morbi-mortalité CV, révélée dans ces études épidémiologiques, apparaît comme un réel enjeu de santé publique. Il semble ainsi nécessaire de mieux comprendre les mécanismes d'action des édulcorants sur l'organisme et notamment sur le système CV. Dans ce contexte, il est aujourd'hui bien démontré que l'altération de la fonction vasculaire est un marqueur précoce et sensible du dysfonctionnement CV et ainsi du développement de maladies CV. En effet, lors d'une précédente étude au sein de notre laboratoire nous avons rapporté que l'arbre artériel est particulièrement sensible aux perturbations transitoires ou prolongées de l'homéostasie du glucose, même chez des personnes jeunes et en bonne santé (Loader et al., 2017 ; Walther et al., 2015).

Ainsi, dans un premier temps, nous avons caractérisé les effets d'une consommation chronique d'un cocktail d'édulcorants (Ace-K et sucralose) sur la fonction vasculaire d'une population de rats sains.

Si ces études épidémiologiques s'intéressent aux effets de la consommation d'édulcorants sur la santé, elles ne permettent pas d'identifier les potentiels effets spécifiques de chacune des molécules appartenant à cette famille d'additifs alimentaires. Or, il est probable que chaque molécule édulcorante puisse être à l'origine d'une réponse physiologique, notamment métabolique, qui lui est propre. Deux études, très récentes, rapportent chez l'animal et chez l'Homme des effets différenciés, propres à la consommation d'édulcorants particuliers, sur la régulation de la composition corporelle ou encore sur la sensibilité à l'insuline (Sánchez-Tapia et al., 2019 ; Higgins et Mattes, 2019). De la

même façon, ces éléments pourraient suggérer que les différents édulcorants ne participeraient pas de la même façon au développement du risque CV. Toutefois, il n'existe aucune indication précisant les effets spécifiques de chacune des molécules édulcorantes sur la santé, dû au manque de données scientifiques sur le sujet.

Ces édulcorants ne contenant pas ou peu de calories, sont souvent consommés par la population qui les perçoit comme une alternative au sucre, « bénéfique pour la santé », leur permettant de perdre du poids ou de minimiser l'impact glycémique de certains produits alimentaires (Webb et al., 2020). Pour ces raisons notamment, les personnes en situations d'obésité ou atteintes d'un diabète sont des consommateurs importants d'aliments ou de boissons contenant des édulcorants (Sylvetsky et al., 2012 ; Hedrick et al., 2017). Parallèlement, il est intéressant de noter que les études de cohorte rapportent notamment un sur-risque de morbi-mortalité CV chez ces patients consommateurs de boissons édulcorées (Malik et al., 2019, Mossavar-Rahmani et al., 2019). Néanmoins, ces analyses doivent être complétées étant donné le risque de causalité inhérent à ces situations pathologiques et aux habitudes alimentaires. Néanmoins, cette causalité n'est pas clairement établie puisqu'il s'agit de données observationnelles et non d'études interventionnelles, qui ne permettent pas d'établir la séquence des événements.

Par conséquent, ce deuxième travail de thèse a eu pour objectif d'évaluer, dans le cadre d'un régime équilibré ou riche en gras, les effets de la consommation de sucralose, édulcorant de synthèse le plus utilisé actuellement dans l'industrie agro-alimentaire, sur la composition corporelle, le contrôle glycémique et la fonction vasculaire de souris.

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la consommation chronique de sucralose et/ou d'Ace-K, les effets sur la fonction vasculaire et le contrôle glycémique d'une exposition aiguë au sucralose et ou à l'Ace-k ont également été explorés au cours d'études complémentaires.

Ces deux protocoles de recherche, ainsi que les résultats additionnels de cette thèse, ont cherché à répondre à un objectif général, visant à identifier les effets d'une consommation chronique de boissons contenant des édulcorants de synthèse et non caloriques, seuls ou en synergie, sur le contrôle glycémique et la physiologie vasculaire, afin de comprendre le risque accru d'évènements cardiovasculaires observé chez les consommateurs fréquents d'édulcorants.

REVUE DE LITTERATURE

1. Sucre ou édulcorant : le dilemme de l'alimentation contemporaine

Alors qu'originellement très peu d'aliments étaient en mesure de procurer un goût sucré (fruits, baies, plantes, etc.), l'Homme a rapidement appris à concentrer puis à identifier les molécules responsables de ce goût sucré, afin de les produire à plus grande échelle grâce à des procédés industriels.

Actuellement l'ensemble de la population, regroupant les individus en bonne santé ou atteints de maladies chroniques, consomme une large gamme de produits alimentaires au goût sucré. Les composants traditionnels responsables du goût sucré sont soit des sucres inhérents à l'aliment soit des sucres ajoutés. Ces derniers sont fréquemment retrouvés dans l'industrie agro-alimentaire. Plus récemment, des molécules visant à remplacer ces sucres comme les édulcorants d'origine naturelle et de synthèse ont été introduites en réponse à l'évolution des habitudes alimentaires.

a. Les agents du goût sucré

i. Le sucre

Les prémices de l'utilisation du sucre comme produit alimentaire apparaissent dans les îles de la Nouvelle-Guinée, où les habitants avaient l'habitude de mâcher la canne à sucre (Vitoux, 2009). Depuis, le sucre extrait de la canne, ou « saccharose » de son nom scientifique, s'est peu à peu répandu sur la planète au gré des croisades et de l'implantation de colonies. Au XVII^{ème} siècle, le saccharose commence alors à occuper une place fondamentale dans l'économie mondiale. En France, de nombreuses raffineries se développent en lien avec les exploitations de la canne à sucre dans les Antilles. Les différents conflits en Europe, notamment entre Napoléon et les Anglais, entraînent une fermeture de la route des Antilles. En 1811, au vu de la rentabilité des usines de production à base de betteraves sucrières en Europe, Napoléon décide d'interdire le sucre de canne (Asadi, 2007 ; Arzate, 2005). Depuis, la mécanisation des récoltes, la sélection des semences et les progrès en génétique élève la France au rang de premier producteur européen et deuxième producteur mondial de saccharose issu de la betterave (Agreste 2019, CEDUS 2019).

Le terme « sucre » est souvent employé pour parler spécifiquement du sucre de table dans le langage courant, composé exclusivement par des molécules de saccharose. Or, cette terminologie englobe en réalité plusieurs molécules dont les plus fréquemment retrouvées dans l'alimentation sont le glucose, le fructose, le lactose et le galactose (Fig. 1).

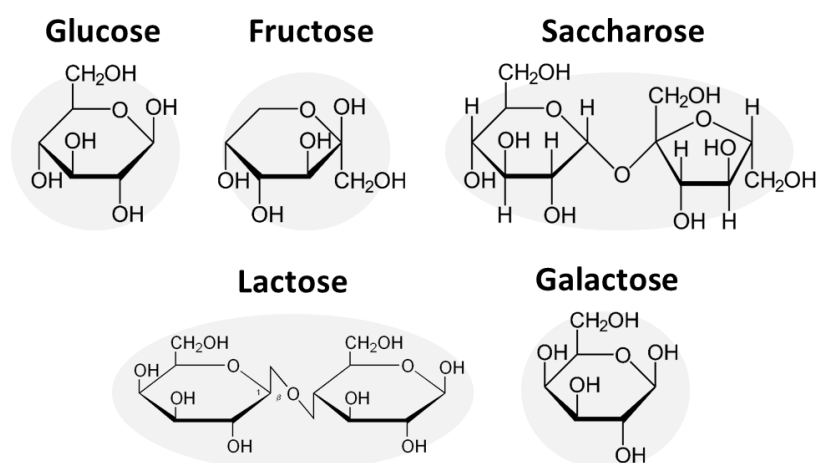


Figure 1 : Structure chimique des sucres présents dans l'alimentation

ii. Les édulcorants

Historiquement, cela fait des siècles que l'Homme tempère l'acidité ou l'amertume de ses préparations avec les produits qui l'entourent tels que les fruits ou le miel. Toutefois, dans l'Antiquité les civilisations préparent le sapa, une réduction de jus de raisin possédant un pouvoir sucrant particulièrement puissant. Plus tard, on comprendra que le phénomène à l'origine de ce pouvoir sucrant décuplé est expliqué par l'interaction entre l'acide du raisin et les atomes de plomb composant la marmite dans laquelle était chauffée la préparation. Cette substance est ainsi la première à répondre aux critères de la définition actuelle de l'édulcorant.

Au sens strict, les édulcorants désignent toutes les substances procurant une saveur sucrée. Toutefois, il est à noter que l'appellation « édulcorant » est aujourd'hui employée pour désigner spécifiquement une catégorie de molécules ne contenant pas ou très peu de calories et possédant pour certaines un pouvoir sucrant largement supérieur à celui du saccharose. C'est par conséquent cette définition que nous utiliserons sous la terminologie « d'édulcorant » dans ce manuscrit.

Il faut attendre le XIX^{ème} siècle pour assister à la découverte de diverses molécules édulcorées, extraites de produits naturels ou synthétisées chimiquement. Parmi ces édulcorants, certains possèdent un goût similaire à celui du saccharose, tandis que d'autres procurent une sensation sucrée des centaines de fois plus intense. De même, ces molécules ne contiennent pas toutes la même charge

calorique. C'est sur ces critères que se fera la distinction entre les édulcorants de charge, peu caloriques avec un faible pouvoir sucrant, et les édulcorants intenses, ne contenant aucune calorie pour la plupart et possédant un pouvoir sucrant largement supérieur à celui du sucre lui-même.

Actuellement, ce sont les édulcorants intenses de formulation synthétique qui occupent la plus grande partie du marché mondial des édulcorants. Ainsi, les édulcorants de charge tout comme les édulcorants intenses naturels ne seront pas traités dans ce manuscrit. Seule l'étude des édulcorants intenses de synthèse sera abordée.

Le premier édulcorant intense de synthèse est découvert en 1879 de manière fortuite. En effet, des travaux scientifiques s'intéressant aux dérivés de houille débouchent sur la découverte d'une molécule procurant un goût sucré très puissant, largement supérieur à celui du saccharose. Il s'agit de la saccharine, premier édulcorant dont l'Homme fera l'usage notamment lors de la seconde guerre mondiale pour pallier au rationnement de sucre.

A la suite de cette découverte sont nés plusieurs édulcorants intenses de formulation synthétique. Les plus connus sont le cyclamate, l'aspartame, l'Ace-K ou encore le sucralose. L'intérêt de l'utilisation de ces molécules était d'abord économique puisque pour un goût sucré équivalent à celui du saccharose, une moindre quantité de matière est nécessaire. Mais actuellement, les édulcorants intenses sont plutôt consommés dans le but de limiter l'apport calorique journalier et dans le même temps la prise de masse corporelle (Webb et al., 2020).

Parmi ces édulcorants, certains sont utilisés de manière préférentielle par l'industrie agroalimentaire. En effet, selon un rapport publié par le *Business Wire* en 2016, le sucralose représente 30% des investissements du marché mondial des édulcorants. Le reste du marché se divise principalement entre l'aspartame (19%), la stévia et la saccharine (16% chacune), le cyclamate (11%), l'Ace-K (7%) et le néotame (1%) (Business Wire, 2016). La plupart du temps, on retrouve ces édulcorants associés entre eux sous forme de mélange. Cette stratégie a pour intérêt de masquer l'arrière-goût procuré par la molécule seule mais aussi d'optimiser le pouvoir sucrant de ces molécules qui agissent alors en synergie (Schiffman et al., 1995 ; Reyes et al., 2019). Ce type de mélange est notamment retrouvé dans les boissons et les sodas sans sucres, reconnus comme étant les produits contenant la plus grande concentration d'édulcorants (Hackett et al., 2014). Toutefois, peu de données indiquent la quantité exacte d'édulcorants ajoutée aux préparations. Les données publiées les plus

récentes, rapportent que 92 et 52 mg de sucralose et d'Ace-K sont retrouvés respectivement dans 1,5L d'une boisson sans sucres très largement consommée dans le monde (Young et al., 2017). Ha et coll. indiquent que dans un panel représentatif de boissons dites sans sucres, la quantité de sucralose varie entre 3,9 à 104,9mg pour le sucralose et 39,6 à 49,2mg pour l'Ace-K dans une boisson de 330mL (Ha et al., 2013). Dans un rapport de l'OQALI datant de 2012, le mélange Ace-K/sucralose est le deuxième mélange le plus utilisé, retrouvé dans 17% des boissons rafraichissantes sans alcool, derrière l'association Ace-K/aspartame (OQALI, 2012). Toutefois, des données plus récentes montrent une augmentation croissante de l'utilisation du sucralose au détriment de l'aspartame (OQALI, 2019 ; Sylvetsky et Rother, 2016). De plus, des données s'intéressant à la consommation de sucralose par la population australienne rapporte une augmentation de 10% du taux de présence de sucralose dans les eaux usées, suggérant à la fois une augmentation de l'utilisation de cette molécule par l'industrie, mais aussi une circulation de cette molécule dans les réseaux d'eau potable (Li et al., 2020).

Pour l'ensemble de ces raisons, au cours de ce travail de thèse, nous avons focalisé nos questions de recherche sur les effets de la consommation de sucralose, seul ou couplé à l'Ace-K. Pour synthèse, le tableau 1 ci-dessous présente les différents édulcorants intenses de formulation synthétique autorisés sur le marché européen.

Tableau 1 : Edulcorants intenses autorisés en Europe.

(*)En considérant le pouvoir sucrant du saccharose = 1

Composé	Apport calorique (kcal/g)	Pouvoir sucrant*	Origine	Code additif
Acesulfame potassium	0	200	Artificiel	E950
Advantame	~ 0	20 000	Artificiel	E969
Aspartame	4	200	Artificiel	E951
Cyclamate	0	20-40	Artificiel	E952
Néohespéridine Dihydrochalcone (NHDC)	2	400-600	Artificiel	E959
Néotame	0	7 000-13 000	Artificiel	E961
Saccharine	0	300-400	Artificiel	E954
Glycoside de stéviol	0	200-300	Naturel	E960
Sels d'aspartame-acesulfame	0	250	Artificiel	E962
Sucralose	0	600	Artificiel	E955
Thaumatine	0	1 600-3 000	Naturel	E957

Tous les édulcorants sont considérés comme des additifs alimentaires, les obligeant ainsi à se soumettre à une réglementation particulière. Ils possèdent ainsi un code d'identification (i.e. E955, E950 pour le sucralose et l'Ace-K respectivement, Tab. 1), et doivent faire l'objet, en Europe ou aux Etats-Unis, d'une demande à l'EFSA ou à la FDA respectivement afin d'être utilisés dans les produits de consommation. L'EFSA ou la FDA évalue alors la sécurité des nouveaux édulcorants avant qu'ils ne soient autorisés dans leur territoire respectif. Elles établissent, en fonction des rapports scientifiques disponibles, une dose journalière admissible pour chaque molécule. Cette donnée, nommée DJA, indique le seuil en dessous duquel la consommation d'un édulcorant reste sans risque pour l'Homme. Elle s'exprime en mg de produit ingéré par kilo de poids de corps et par jour (mg/kg/jr). Ainsi, en Europe, la DJA du sucralose est fixée à 15 mg/kg/jr et celle de l'Ace-K à 9 mg/kg/jr. Aux Etats-Unis, la DJA est de 5 mg/kg/jr pour le sucralose et 15 mg/kg/jr pour l'Ace-K. Il est prévu, courant 2021, que ces édulcorants fassent l'objet d'une réévaluation de la part de l'EFSA afin de réajuster si nécessaire les DJA fixées, ou de retirer éventuellement les produits concernés du marché selon les nouvelles données scientifiques présentées. Afin de contribuer à la prévention du risque sanitaire associé à la consommation d'édulcorants en France, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) peut alerter l'EFSA s'il lui semble nécessaire de réévaluer certaines molécules avant la date prévue.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons fait le choix d'utiliser des concentrations de sucralose et d'Ace-K respectant ou ne dépassant pas de plus de 2 fois la DJA chez l'Homme contrairement à de nombreux travaux de recherche fondamentale ou préclinique utilisant des doses extrêmement élevées (Suez et al., 2014). Les paragraphes suivant présentent les propriétés chimiques et biologiques et les voies de signalisation communément activées par ces deux molécules de synthèse.

Le sucralose

Aussi appelé E955 ou trichlorosaccharose, le sucralose est un édulcorant artificiel intense découvert en 1976 en Grande-Bretagne. Il a une structure ayant pour base celle du sucre de table (saccharose) à laquelle trois groupements hydroxyles ont été remplacés par trois atomes de chlore (Fig. 2).

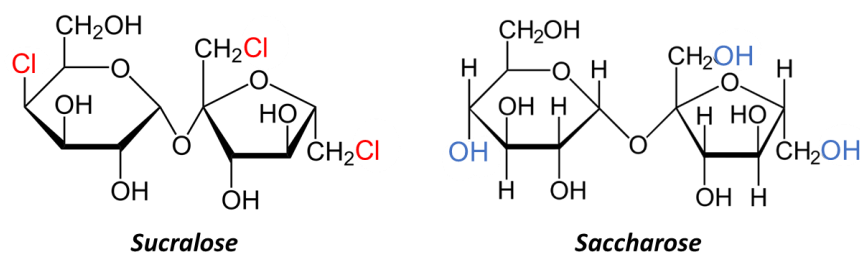


Figure 2 : Structure chimique du sucralose

Sa stabilité à haute température et lors de variations importantes de pH, font de cet édulcorant un additif adéquat pour la préparation de produits alimentaires qui nécessitent d'être cuits au four et/ou qui demandent une longue durée de conservation telles que les boissons par exemple (Quinlan et Jenner 1990). Le sucralose est particulièrement stable sous forme liquide, mais également sous forme solide lorsqu'il est mélangé à la maltodextrine. Son pouvoir sucrant est 600 fois plus important que celui du saccharose et il ne contient aucune calorie. Son utilisation est autorisée dans l'Union Européenne depuis 2004 pour les produits tels que les boissons, les desserts, les laitages, les confiseries ou encore la moutarde.

L'acésulfame de potassium

L'Ace-K, ou E950, a été découvert en Allemagne en 1967 et est autorisé en Europe depuis 1983. Il adopte une structure cyclique et procure un goût sucré 100 à 200 fois plus élevé que le saccharose (Fig. 3).

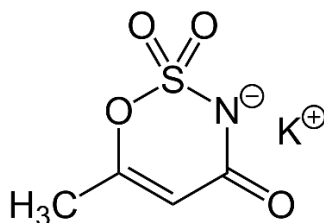


Figure 3 : Structure chimique de l'acésulfame de potassium

Puisque l'Ace-K présente une légère amertume en bouche, il est fréquemment utilisé avec d'autres édulcorants afin de masquer ce goût secondaire. L'Ace-K est également stable à haute température et supporte facilement les variations de pH. Il est ainsi largement retrouvé dans les préparations alimentaires telles que les boissons, pâtisseries, les produits laitiers, les condiments ou encore dans les dentifrices et produits pharmaceutiques.

Au-delà de leurs caractéristiques chimiques, les édulcorants sont des molécules capables d'interagir avec certains récepteurs gustatifs, dont le récepteur au goût sucré classiquement activé par les sucres. Ces récepteurs sont largement décrits au niveau buccal où ils participent à la perception du goût. Ils sont également présents à d'autres niveaux de l'organisme, où ils font l'objet d'études s'intéressant aux réponses cellulaires résultant de leur activation.

b. La perception du goût : structures de détection

La perception du goût est l'un des sens fondamentaux pour l'évaluation de la qualité nutritive de chaque aliment. Par définition, elle décrit la capacité d'un système à reconnaître certaines molécules (sucrées, umami, amères, acides, salées) par l'intermédiaire de structures de détection spécifiques de chacune de ces saveurs. Cette qualité a pour but de prévenir l'ingestion de substances potentiellement toxiques, mais aussi de renseigner sur la valeur nutritionnelle de l'aliment consommé. Ainsi, si à l'origine le goût sucré annonçait l'arrivée d'un apport calorique et l'umami la présence d'acides aminés dans la substance ingérée, le salé permettait d'assurer le contrôle de la balance électrolytique de l'organisme alors que l'amer et l'acide prévenaient de l'éventuelle toxicité d'un aliment. Enfin, la perception de ces différentes saveurs contribue également à la notion de plaisir associée à la prise d'un repas par exemple. Au sens strict du terme, le « goût » correspond au signal perçu par les papilles gustatives sur la langue uniquement. Lorsque cette sensation est associée à celle perçue via l'odorat, on parle de « flaveur ». Au niveau buccal, la détection d'une saveur est possible par l'activation des cellules du goût. Celles-ci, regroupées au niveau des papilles gustatives recouvrant la langue, sont spécifiques d'une saveur donnée et présentent à leur surface le récepteur (sucré, umami, amer) ou le canal (salé, acide) associé à la détection de cette saveur (Fig. 4).

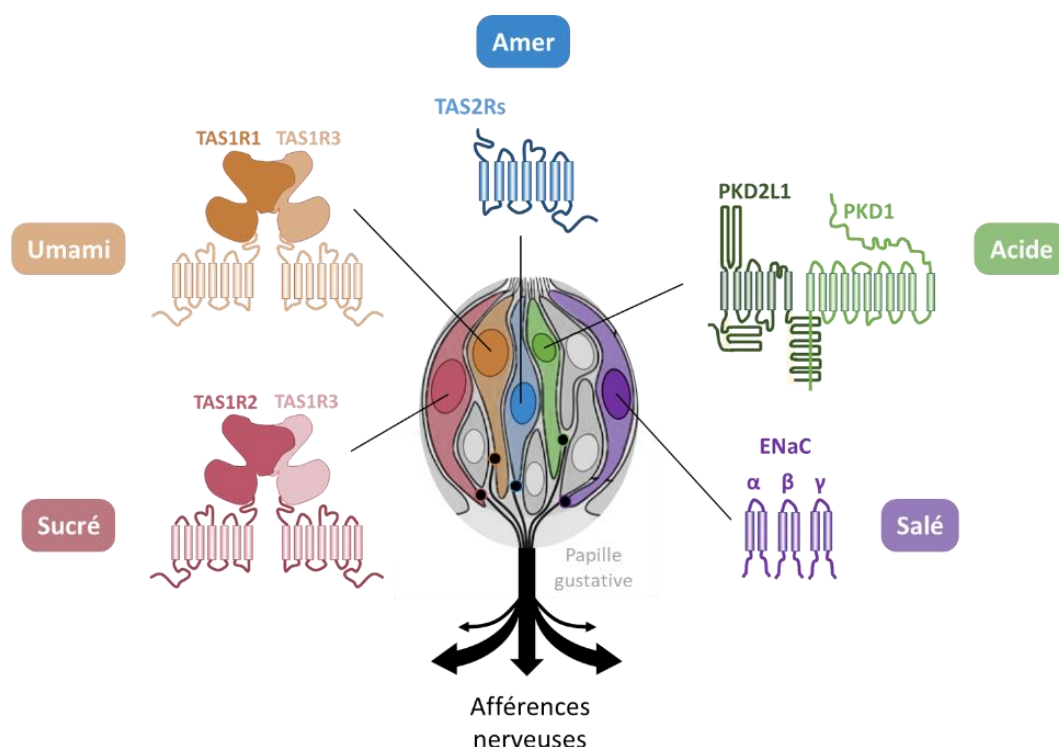


Figure 4 : Typologie de senseurs gustatifs localisés dans la papille gustative

Le sucre ainsi que les édulcorants procurent une saveur sucrée, et donc activent le récepteur associé à celle-ci. Les édulcorants activent également le récepteur au goût amer, expliquant la détection d'une légère amertume lors d'une consommation de certaines de ces molécules. Les paragraphes ci-dessous décrivent brièvement la structure et la physiologie de base de ces récepteurs, qui sont également présentés en langue anglaise dans la revue de littérature publiées dans *Advances in Nutrition* (voir p. 41).

i. Les récepteurs au goût sucré

Les cellules capables de détecter le goût sucré possèdent des structures appartenant à une famille de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Dans cette famille, il existe trois catégories de structure : les récepteurs de type 1 membre 1, type 1 membre 2 (TAS1R2) et type 1 membre 3 (TAS1R3). La détection du goût sucré se fait via les hétérodimères TAS1R2/TAS1R3, et via les homodimères TAS1R3/TAS1R3 récemment mis en évidence (Santa-Cruz Calvo and Egan, 2015). Cette famille de récepteurs de type 1 est ancrée à la membrane plasmique grâce au domaine à sept hélices transmembranaires (TMD) qui caractérise les RCPG. La partie extracellulaire de ces récepteurs, appelée domaine amino-terminal (DAT), abrite deux éléments : un domaine riche en cystéine (DRC)

qui a pour rôle de relier la partie transmembranaire du récepteur au deuxième constituant du DAT, le Venus Fly Trap (VFT). Le DAT de TAS1R2 est le principal site de fixation des molécules au goût sucré telles que le saccharose, le sucralose et l'Ace-K (Sigoillot et al., 2015 ; Nie et al., 2005 ; Nelson et al., 2001 ; Masuda et al., 2012) (Fig. 5). Toutefois, lorsque l'expression tissulaire de TAS1R2 est réduite par rapport à celle de TAS1R3, il a été montré que le sucralose et l'Ace-K sont en mesure de se fixer sur la sous-unité TAS1R3 (Masubuchi et al., 2013 ; Nakagawa et al., 2013). Toutefois, l'affinité du sucralose, tout comme celle des sucres en général, apparaît moindre pour la sous-unité TAS1R3 que TAS1R2 (Sigoillot et al., 2015).

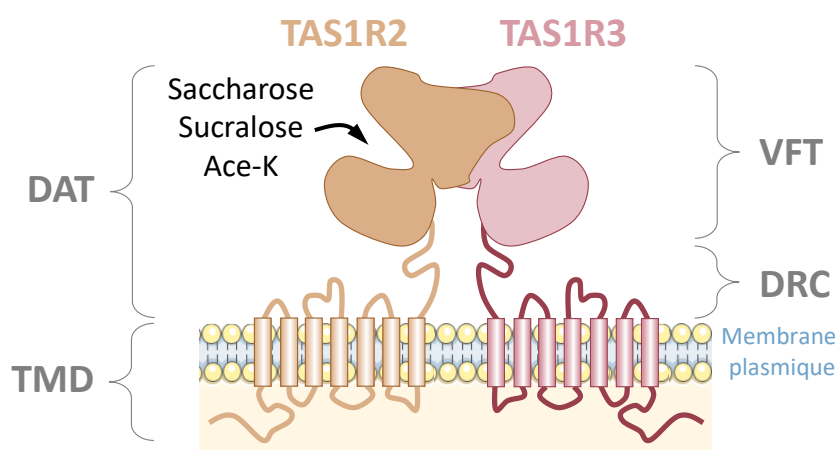


Figure 5 : Structure du récepteur du goût sucré

TAS1R2/3 : récepteur gustatif de type 1 membre 2/3, Ace-K : acésulfame de potassium, DAT : domaine aminoterminal, TMD : transmembranaire domaine, VFT : venus fly trap, DRC : domaine riche en cystéine

ii. Les récepteurs au goût amer

Les récepteurs de l'amertume appartiennent à la famille des récepteurs de type 2 (TAS2R) qui sont également couplés aux protéines G. On peut compter de 4 à 11 récepteurs présents sur chaque cellule du goût amer. L'amertume est détectée par le domaine à sept hélices transmembranaires constituant chaque récepteur (Fig. 6). Contrairement aux sucres, certains édulcorants comme l'Ace-K sont capables d'interagir avec les cellules du goût amer via les récepteurs que ces dernières possèdent à leur surface (Dubois et al., 2016 ; Kuhn et al., 2004 ; Pronin et al., 2007). Concernant le sucralose, aucune étude, à notre connaissance, montre sa capacité à activer le récepteur au goût amer chez l'Homme. Néanmoins, on ne peut pas exclure le fait que le sucralose puisse avoir un effet sur ce type de récepteur, même si la littérature sur ce sujet reste limitée. En effet, une étude de 2015 effectuée chez le rat, a pu notamment montrer que l'aversion induite par le sucralose chez certains rats était

probablement due à leur capacité de détection d'une amertume dans la boisson (Torregrossa et al., 2015). Dans une deuxième étude plus récente, Lasconi et coll. montrent la capacité du sucralose à activer la même population de cellules trachéales qu'un agoniste des récepteurs du goût amer (Lasconi et al., 2019).

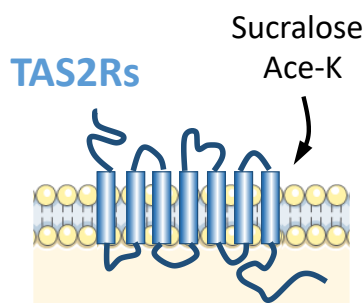


Figure 6 : Structure du récepteur au goût amer

TAS2Rs : récepteur gustatif de type 2, Ace-K : acésulfame de potassium

c. Signalisation associée à l'activation des récepteurs gustatifs

Une fois que l'agoniste sucré ou amer entre en contact avec son récepteur au niveau buccal, une cascade de signalisation, spécifique en fonction des cellules gustatives activées, se déclenche. La transmission du goût, depuis le récepteur jusqu'aux structures cérébrales concernées, nécessite la dépolarisation de la cellule d'intérêt. Le potentiel d'action ainsi généré permet alors l'intégration de l'information gustative au niveau du système nerveux central.

Alors que la transmission du goût salé ou acide se fait simplement par le passage d'ion Na^+ ou H^+ respectivement via le canal qui leur est dédié, l'activation des récepteurs au goût umami, sucré et amer par leur ligand, déclenche une cascade de signalisation plus complexe. La signalisation, associée à la détection du goût sucré ou amer, à laquelle nous nous sommes intéressés au cours de ce doctorat, est commune à ces deux saveurs. En effet, cette stimulation entrainera d'abord une dissociation de la protéine G puis une augmentation de l'activité de la phospholipase C- β 2 (PLC), ayant pour effet d'activer le récepteur à l'inositol 1,4,5-triphosphate de type 3 localisé sur le réticulum endoplasmique. Cela permettra d'une part le relargage d'ions calcium dans le cytoplasme, et d'autre part l'ouverture de certains canaux ioniques voltage-dépendant (TRPM5). Ce mécanisme de transduction conduira ainsi à la dépolarisation de la cellule et à la libération d'un potentiel d'action entraînant la libération d'adénosine triphosphate (ATP) qui agira alors comme neuromédiateur pour activer les nerfs gustatifs afférents (Sigoillot et al., 2015 ; Lee et Owyang, 2017) (Fig. 7).

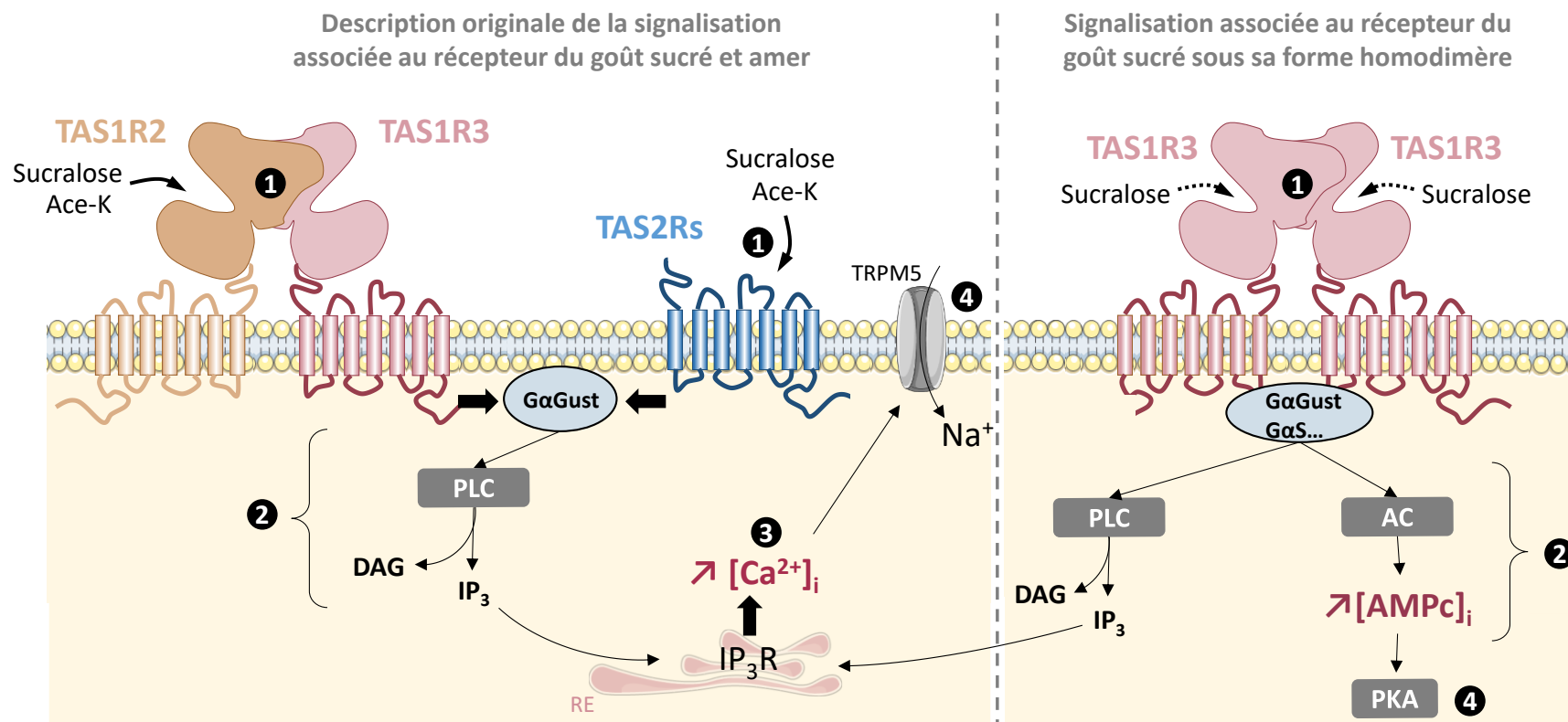


Figure 7 : Voie de signalisation activée après stimulation des récepteurs au goût sucré et amer.

TAS1R2/3 : récepteur gustatif de type 1 membre 2/3, TAS2Rs : récepteurs gustatifs de type 2, Ace-K : acésulfame de potassium, TRPM5 : canaux ioniques voltages dépendants type M membre 5, GαGust : protéine G α-gustducin, PLC : phospholipase C, DAG : diacylglycerol, IP₃(R) : (récepteur) inositol triphosphate, RE : réticulum endoplasmique, $[Ca^{2+}]_i$: concentration calcique intracellulaire, Na⁺ : ion sodium, $[AMPc]_i$: concentration intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique, PKA : protéine kinase A.

1) Activation du récepteur 2) Augmentation de l'activité de PLC conduisant à l'augmentation d'IP₃ intracellulaire. Activation de l'adénylate cyclase et production d'AMPc 3) Liaison d'IP₃ avec son récepteur au niveau du réticulum endoplasmique induisant un relargage de calcium intracellulaire 4) Entrée de sodium et dépolarisation cellulaire. Activation de PKA suivant la production d'AMPc, responsable de conséquences diverses selon le type cellulaire étudié.

d. Mécanisme d'absorption et métabolisation cellulaire

Au-delà de leur saveur, les sucres apportent une valeur énergétique équivalente à 4 kcal/g et leur métabolisation est essentielle au maintien des grandes fonctions de l'organisme. Au contraire, le sucralose et l'Ace-K ne possèdent aucune valeur énergétique, et ne suivent pas les mêmes cinétiques de traitement post-ingestion.

i. Les glucides

Les sucres ou « glucides » constituent le combustible principal de l'organisme permettant la production de chaleur mais également la fabrication du substrat énergétique majeur de la cellule (ATP). Ils constituent également un élément essentiel au maintien de la réserve énergétique de l'organisme, sous forme de glycogène.

Le saccharose, le glucose, le lactose, le galactose ou encore le fructose font partie de la grande famille des glucides, et plus particulièrement des glucides simples. En effet, cette dernière regroupe les molécules possédant une structure osique (monosaccharide, glucose et fructose) ou diholosique (disaccharide, saccharose), procurant le plus souvent un goût sucré aux aliments qui les abritent (fruits, sucre de table). Cette catégorie s'oppose à celle des glucides complexes, caractérisée par des groupements moléculaires de plus de deux oses (polysaccharide, amidon) et qui, la plupart du temps, n'apportent pas un goût sucré intense (céréales, féculents) (Fig. 8).

	<i>Types</i>	<i>Exemples</i>	<i>Sources</i>
GLUCIDES SIMPLES	Monosaccharide <i>1 sucre</i>	 Glucose  Fructose  Galactose	Sodas, concentrés, fruits, produits laitiers
	Disaccharide <i>2 sucres</i>	 Saccharose  Lactose  Maltose	Sucre de table, produits laitiers, boissons énergisantes
GLUCIDES COMPLEXES	Polysaccharide <i>>10 sucres</i>	 Amidon Cellulose	Céréales, pommes de terre, végétaux

Figure 8 : Classification des glucides

Une fois ingérés, les glucides (simples et complexes) sont hydrolysés dans l'intestin grêle en monosaccharides (glucose, fructose, galactose). Ces molécules vont être utilisées par l'organisme dans les processus cellulaires ou bien stockées dans le tissu adipeux (sous forme de triglycérides), le foie et le muscle (sous forme de glycogène, un polymère de glucose), afin de contribuer à la réserve énergétique globale.

Le glucose, principal substrat énergétique cellulaire

Parmi les glucides absorbés au niveau intestinal, 80 à 90% seront assimilés sous forme de glucose, avant de passer dans la circulation sanguine. En effet, ce monosaccharide est essentiel au fonctionnement de certains groupes cellulaires, constituant notamment le substrat exclusif des neurones et des éléments figurés du sang. Le passage du glucose de la lumière intestinale à la circulation sanguine provoque une hyperglycémie (HG) « transitoire » au niveau systémique, qui est rapidement détectée et régulée par la sécrétion pancréatique d'insuline. La sécrétion de cette hormone permet alors l'entrée de glucose dans les cellules de ses tissus cibles insulino-dépendants que sont les compartiments musculaires, adipeux et hépatique et permet ainsi de ramener les taux de glucose sanguin à leurs valeurs basales. Ces effets physiologiques sont contrebalancés par les effets du glucagon, sécrété par les cellules alpha pancréatique et ayant une action hyperglycémiante en favorisant la glycogénolyse au niveau hépatique (Faerch et al., 2016).

Le rôle de l'insuline

L'homéostasie glucidique joue un rôle clé dans l'équilibre métabolique, qui nécessite d'être finement régulé. L'insuline, une hormone peptidique constituée de deux chaînes d'acides aminés sécrétée par les cellules β -pancréatiques (cellules- β), joue un rôle majeur dans cette régulation. Les valeurs de glycémie considérées comme physiologique à jeun sont comprises entre 0,63 à 1,1g/L de sang (soit 3,5 à 6,1mM). L'augmentation de la glycémie à la suite d'un repas (>1,1g/L (soit 6,1mM)) conduit à la sécrétion d'insuline dont l'action se porte principalement sur le muscle squelettique, le foie et les tissus adipeux. Dans ces tissus, elle permet le recrutement des transporteurs du glucose (GLUT4) à la membrane plasmique permettant ainsi l'entrée du glucose dans les cellules (Fig. 9).

L'action de l'insuline est médiée par l'activation de son récepteur (IR, *insulin receptor*), composé de deux sous-unités α extracellulaires qui lient l'insuline et de deux sous-unités β qui

possèdent une activité tyrosine kinase intracellulaire. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation de sa sous-unité β , stimulant ainsi l'activité tyrosine kinase du récepteur envers ses substrats cellulaires IRS et Shc (*Insulin Receptor Substrate* et *Src Homologous and Collagen protein* respectivement) (Patti et Kahn, 1998). L'interaction de l'IRS avec la phosphatidyl inositol-3-kinase notamment, pourra engendrer les différents phénomènes énoncés précédemment dont la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 à la membrane via l'activation de la voie Akt/PKB (Uhlenhaut and Treier, 2011 ; Combettes-souverain et Issad 1998) (Fig. 9).

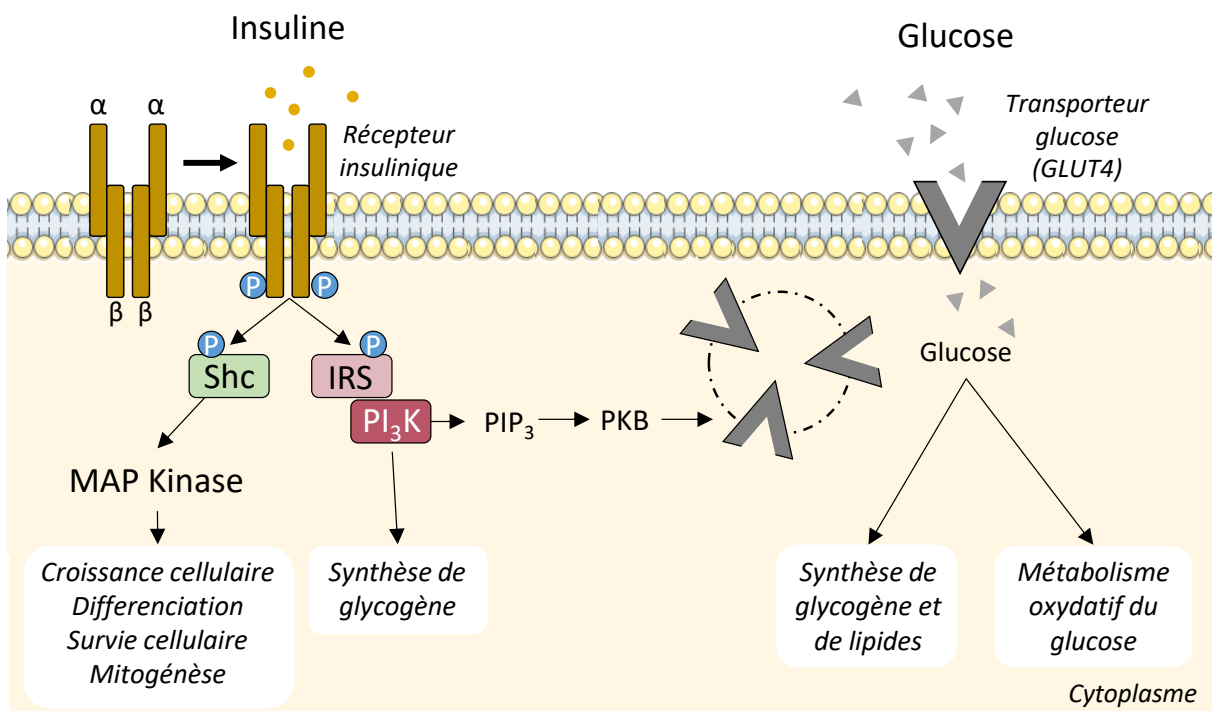


Figure 9 : Cascade de signalisation médiée par la fixation de l'insuline sur son récepteur dans la cellule musculaire et adipeuse. PI₃K : phosphatidyl inositol-3-kinase ; IRS : Insulin Receptor Substrate ; Shc : Src Homologous and Collagen protein ; PKB : Protéine Kinase B ; MAP-K : Mitogen activated protein.

Adapté de Mangmool et al. 2017.

Ainsi, le glucose entrant sera oxydé en pyruvate via la glycolyse, puis transformé en acétyl coenzyme A dans la mitochondrie pour enfin prendre part au cycle de Krebs. Cet enchainement de réactions chimiques permet la production d'énergie en donnant lieu à la formation de 36 molécules d'ATP et induit également la production de facteurs donneurs d'électrons (NADH, FADH₂) participant aux processus de respiration cellulaire (Fig. 10).

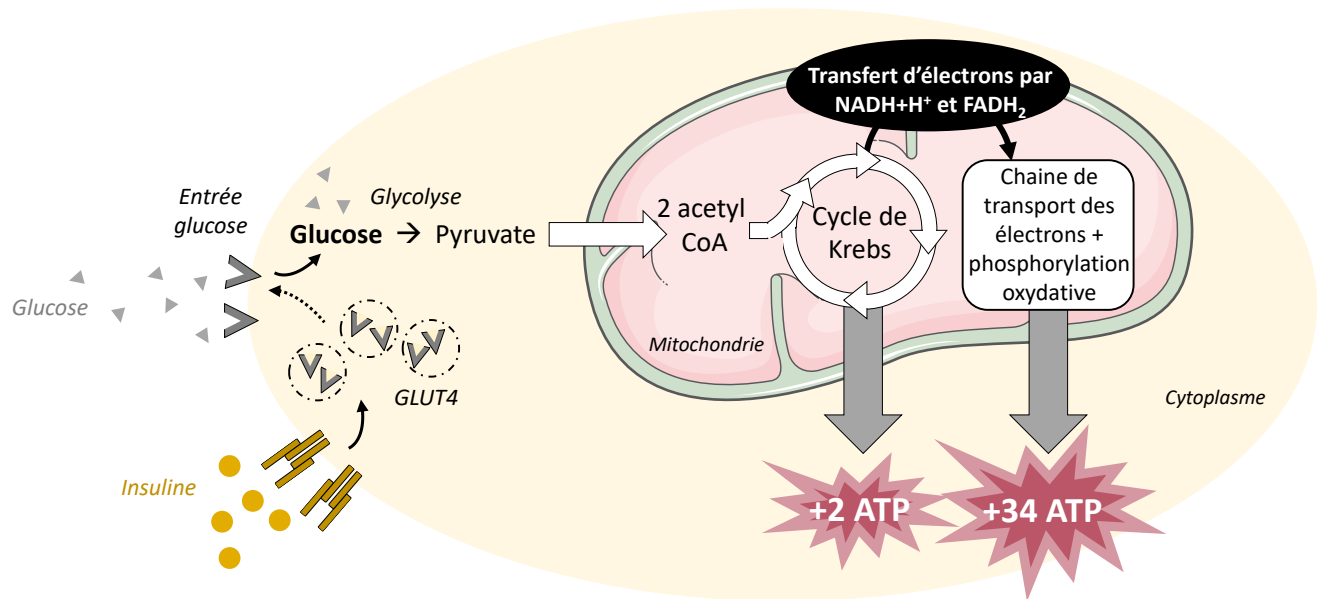


Figure 10 : Utilisation du glucose dans la production d'ATP des cellules de tissus insulino-dépendants.

Adapté de Campbell (1996).

Le glucose qui n'aura pas été utilisé dans ce processus énergétique est stocké sous forme de glycogène ou de triglycéride selon les tissus. En effet, le recrutement des transporteurs GLUT4 médié par l'insuline au niveau des tissus insulino-dépendants favorise le stockage du glucose sous forme de glycogène (glycogénogénèse) au niveau musculaire et hépatique en augmentant la captation du glucose dans ces tissus. Cette captation est également augmentée via l'action de l'insuline au niveau des territoires musculaires squelettiques. En effet, celle-ci possède une fonction vasomodulatrice, notamment en faveur de la vasorelaxation des artérioles, permettant d'induire une augmentation du recrutement capillaire permettant alors une plus grande captation de glucose par ce tissu, de par l'augmentation de la surface d'échange entre le sang et les cellules musculaires squelettiques (Rossi et al., 2005 ; Serné et al., 2002 ; Potenza et al., 2009). Au niveau du foie et du tissu adipeux, l'action de l'insuline et l'entrée de glucose associée conduira à la transformation de ce glucose sanguin en triglycérides via le mécanisme de la lipogénèse.

L'action de l'insuline permet donc de participer à la production d'énergie cellulaire mais également de favoriser le stockage de réserves énergétiques, permettant *in fine* de rétablir l'homéostasie glucidique (Fig. 11).

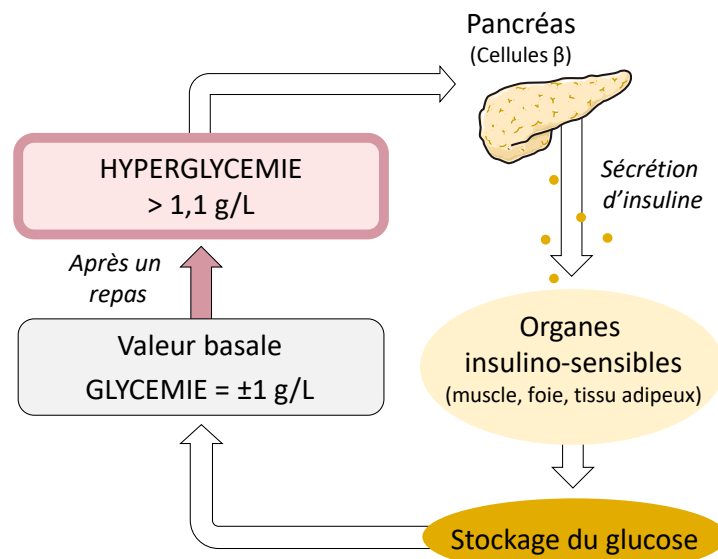


Figure 11 : Boucle de régulation de la glycémie par l'insuline

Dans une moindre mesure, d'autres hormones sont connues pour agir de concert avec l'insuline dans la régulation de la glycémie telle que les incrétines ou encore la leptine.

Le rôle des incrétines

Les incrétines, représentées principalement par le peptide insulino-trope dépendant du glucose (GIP) et le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1), sont des hormones sécrétées par les cellules K duodénales et L jéjunales respectivement lors de la présence de glucose dans la lumière intestinale. Ces incrétines ont pour rôle de potentialiser la réponse au glucose des cellules-β, conduisant à une prise en charge plus efficace du glucose sanguin et au stockage de celui-ci au niveau hépatique, adipeux et musculaire (Opinto et al., 2013). On estime que 50 à 70% de la sécrétion d'insuline en réponse à un repas est liée à l'effet des incrétines (Nauck et al., 1986 ; Muscelli et al., 2006). Des travaux ont montré que malgré l'ingestion de concentrations croissantes de sucre, les pics de glucose obtenus pour chacune de ces concentrations ne différaient pas entre eux, et que ce phénomène était corrélé à une adaptation des concentrations plasmatiques d'incrétines suite à ces charges en glucose (Bagger et al., 2011). En plus d'encourager la sécrétion d'insuline en présence de glucose, la sécrétion de GLP-1 va permettre d'inhiber la sécrétion de glucagon, ralentir la vidange gastrique et d'induire une sensation de satiété régulant ainsi la prise alimentaire (Turton et al., 1996 ; Schjoldager et al., 1989 ; Hansotia et Drucker 2005).

Le rôle de la leptine

La leptine est une hormone sécrétée principalement par le tissu adipeux blanc, en réponse à l'ingestion d'aliments et/ou la sécrétion d'insuline (Barr et al., 1997 ; Tsai et al., 2012). Elle agit au niveau hypothalamique principalement, induisant, via des récepteurs spécifiques, la sensation de satiété et augmentant la dépense énergétique (Klok et al., 2007 ; Pandit et al., 2017). Elle contribue également à l'homéostasie glucidique en inhibant la sécrétion de glucagon et la néoglucogénèse hépatique tout en augmentant la captation du glucose par le muscle squelettique, le cœur mais également le tissu adipeux brun (D'souza et al., 2017, Amitani et al., 2013). De plus, elle joue un rôle dans la régulation de l'insuline en inhibant la sécrétion de cette dernière par les cellules- β ainsi qu'en bloquant l'action de GLP-1 sur les structures pancréatiques (Amitani et al., 2013). L'action de la leptine est contrée par la ghréline qui stimule la prise alimentaire et favorise le stockage énergétique, de ce fait celle-ci considérée comme l'agoniste inverse de la leptine (Poher et al., 2018).

L'action combinée des acteurs décrit dans ce sous-chapitre participe ainsi à la régulation fine du taux de glucose sanguin et à un retour aux valeurs glycémiques basales.

ii. Le sucralose et l'acésulfame de potassium

Les édulcorants, tels que le sucralose et l'Ace-K, sont des molécules de synthèse qui ne semblent pas ou très peu métabolisées par l'organisme. Chez l'Homme, le sucralose ingéré par voie orale est très peu absorbé au niveau intestinal et majoritairement éliminé par voie fécale (Fig. 12). Les concentrations plasmatiques de sucralose chez l'Homme oscillent entre 200 et 400ng par mL de plasma (Sylvetsky et al., 2017). Malgré leur faible taux d'absorption, la molécule de sucralose a déjà été retrouvée dans le tissu adipeux de rats, jusqu'à deux semaines après l'arrêt du protocole de gavage au sucralose à une dose de 80,4mg/kg/jour pendant 40 jours, respectant la fourchette de concentration utilisée dans les études toxicologiques (Bornemann et al., 2018). Bien que la plupart des études ne rapporte pas de modification de la structure du sucralose lors de son excrétion, l'utilisation de la molécule sucralose radio-marquée chez le chien a mis en évidence la présence d'un métabolite du sucralose (un glucuronoconjugué) dans les urines, représentant 2 à 8% de la dose ingérée (Wood et al., 2000).

L'Ace-K quant à lui est rapidement absorbé au niveau intestinal pour se retrouver dans la circulation systémique puis excrété, inchangé, par voie urinaire (Rapport de l'Association Américaine de diététique, *American diabetic Association*, 2004) (Fig. 12). Il a été montré chez trois adultes

volontaires de sexe masculin, qu'après la consommation d'une boisson contenant 30mg d'Ace-K, 0,28mg/mL de cette molécule était retrouvé au pic d'absorption (Walker, *International Programme on Chemical Safety*). Les études chez l'Homme, chez l'animal ou encore *in vitro* n'ont montré aucune métabolisation de cet édulcorant avant son excrétion finale. En effet, l'administration orale d'Ace-K radiomarqué n'a pas mis en évidence la présence de métabolites dans le sérum, les urines, les fèces et/ou la bile des modèles de recherches utilisés (Renwick, 1986).

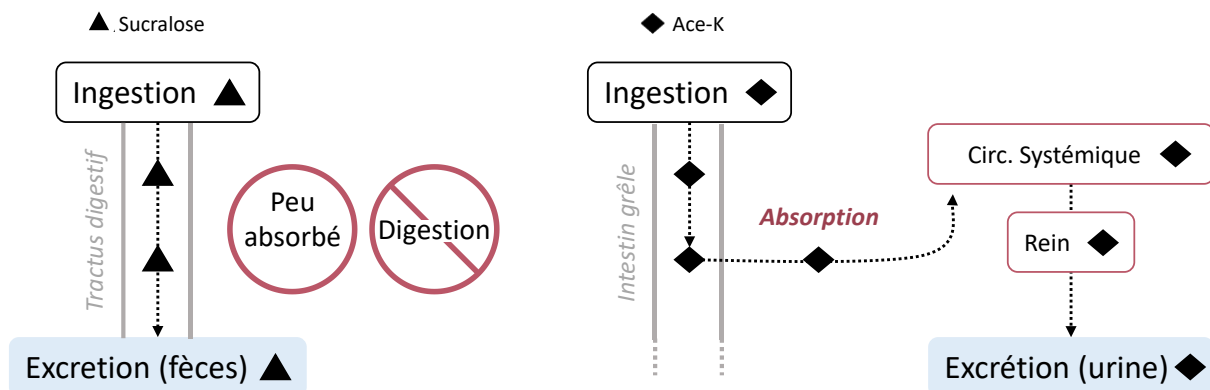


Figure 12 : Devenir du sucralose et de l'acésulfame de potassium après ingestion.

Adapté de Magnuson et al., 2016.

Néanmoins, il est important de noter que certaines études s'intéressant aux effets de l'Ace-K lors de la gestation ont montré sa capacité à traverser le placenta, se retrouvant ainsi dans la circulation et les tissus fœtaux à faible concentration (Magnuson et al., 2016). De plus, l'Ace-K a également été retrouvé dans le lait maternel chez l'animal et chez l'Homme mais, à notre connaissance, les effets induits par cet édulcorant chez la descendance ne restent que très peu documentés (Zhang et al., 2011 ; Sylvestsky et al., 2015). Seule l'étude de Zhang et coll. a pu montrer que la consommation, via le lait maternel, d'Ace-K chez la souris pouvait orienter significativement les préférences de cette descendance pour les aliments sucrés (Zhang et al., 2011).

Du fait de l'incapacité des cellules à métaboliser les édulcorants, ces molécules ne permettent pas la production d'énergie. Néanmoins, les édulcorants sont capables d'influencer les systèmes de régulation énergétique de manière indirecte suite à la stimulation de voies de signalisation notamment dépendantes de l'activation des récepteurs gustatifs sucrés. En effet ces récepteurs, bien que largement décrits au niveau buccal, ont été identifiés dans d'autres organes et tissus de l'organisme. La stimulation de ces récepteurs dans des organes tels que le pancréas, le foie ou au niveau du tissu

adipeux semble jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Maillet et al., 2011 ; Herrera Moro Chao et al., 2016) (Fig. 13).

De la même façon, les récepteurs du goût amer, aussi activés par les édulcorants, ne sont pas uniquement localisés au niveau buccal mais ont une répartition ubiquitaire dans l'organisme. Ils semblent également impliqués dans divers processus physiologiques dont la régulation de la contraction du muscle lisse chez l'animal et chez l'Homme (Manson et al., 2014 ; Lu et al., 2017) (Fig. 13).

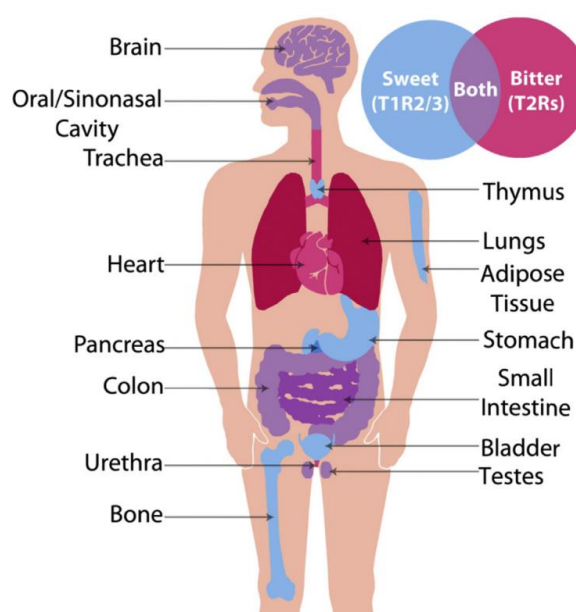


Figure 13 : Répartition corporelle des récepteurs au goût sucré et chez l'Homme.

Reproduit de Freund et Lee, 2018.

Ainsi, bien que ces agents sucrants ne présentent pas les mêmes caractéristiques nutritionnelles que les molécules caloriques telles que le saccharose, de plus en plus de données semblent montrer que les édulcorants sont à même de déclencher des réponses physiologiques, notamment sur le plan métabolique. Par ailleurs, comme pour la consommation de produits sucrés, il est important de questionner les effets d'une consommation chronique de ces molécules édulcorées sur la santé métabolique et CV.

Ce qu'il faut retenir:

- **Les sucres**, tel que le saccharose historiquement, constituent un apport nutritionnel calorique utilisés comme substrat énergétique par la cellule ou stockés pour une utilisation ultérieure selon les besoins de l'organisme (réserve énergétique). De plus, ils possèdent une saveur particulière détectée par le biais de récepteurs spécifiques du goût sucré avec lesquels ils interagissent (Fig. 14).
- **Les édulcorants intenses** sont des molécules de formulation synthétique, non caloriques, qui possèdent un goût sucré des dizaines de fois supérieur à celui du saccharose. Aujourd'hui, le sucralose et l'Ace-K sont les édulcorants les plus utilisés et vendus sur le marché. Bien qu'ils ne soient pas ou très peu métabolisés, leur structure est détectée par les récepteurs au goût sucré et amer (Fig. 14).

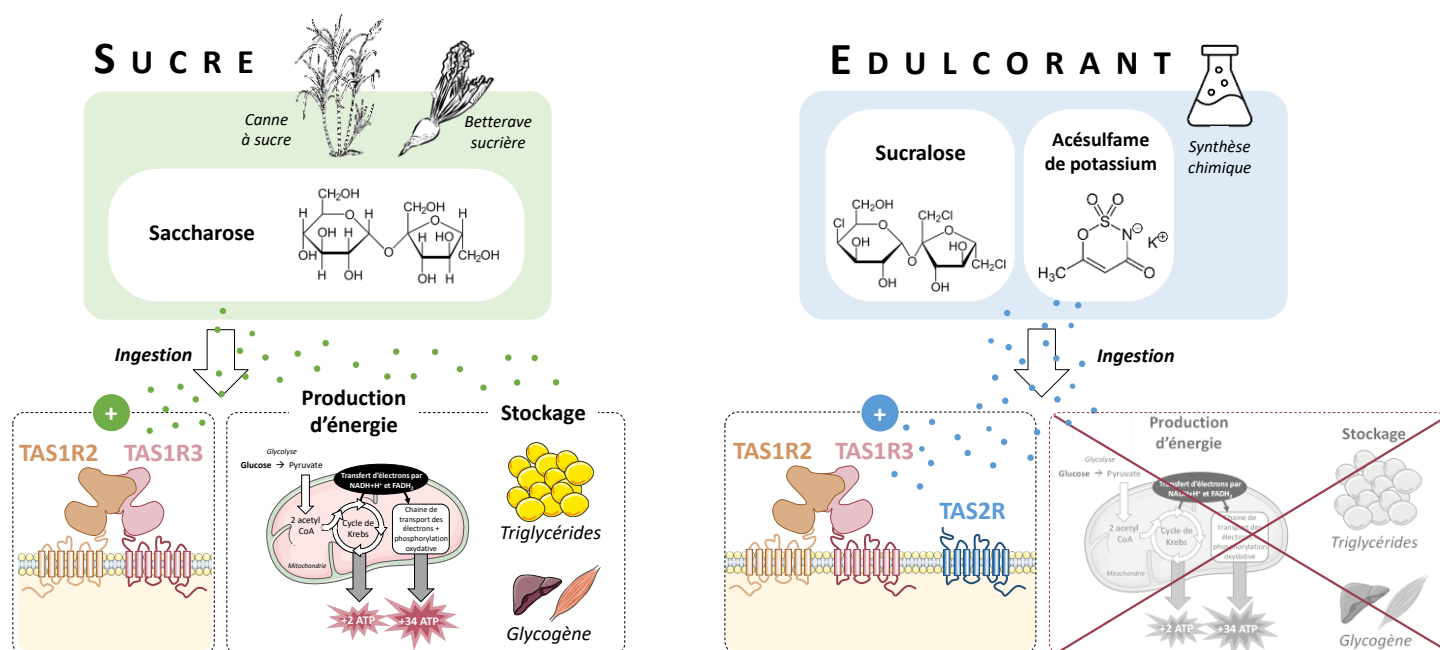


Figure 14 : Agents sucrants et leur différents récepteurs et cascade métabolique associées.

2. Consommation de sucre ou d'édulcorant : conséquences sur la santé cardiométabolique.

Afin d'améliorer et de préserver la santé de la population générale, des organismes publics nationaux et internationaux, en accord avec de nombreuses sociétés savantes, publient régulièrement des recommandations concernant les apports nutritionnels. La quantité de sucre consommée au quotidien n'échappe pas à ces recommandations. Ces dernières se basent sur la quantité de « sucres libres » ou « sucres totaux » que contient chaque produit alimentaire. Selon l'OMS et l'ONUAA (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture), cette appellation désigne l'ensemble des monosaccharides et disaccharides ajoutés aux aliments par le fabricant ou le consommateur, en plus de ceux naturellement présents dans le miel, les sirops, les jus de fruits et les jus de fruits concentrés (WHO, 2002) (Fig. 15).



Figure 15 : Représentation de la présence de sucres libres et/ou totaux dans un produit de l'alimentation générale.

Les dernières recommandations de l'OMS en vigueur préconisent la consommation de moins de 10% de l'apport énergétique total journalier en sucres libres, suggérant même de diminuer cette consommation à 5% (soit 25 g pour un apport de 2000 kcal), hors lactose et galactose (WHO, 2015). En France, l'ANSES préconise une consommation ne dépassant pas les 100 grammes par jour, en ne comptant pas plus d'une boisson sucrée par jour. Toutefois, l'ANSES constate que 20 à 30% de français consomment plus de 100 grammes par jour de sucres libres, impliquant de probables conséquences sur la santé, notamment métabolique ou CV (ANSES, 2016).

a. Données épidémiologiques

i. Consommation de sucre et mortalité cardiovasculaire

La première cause de mortalité dans le monde est liée à la survenue de maladies CV et touche plus particulièrement les patients obèses et diabétiques (OECD, 2017 ; NCD, 2016 ; WHO, 2019). De plus, il est maintenant clairement établi que la consommation importante de sucres libres, qui continue de progresser en France (CREDOC, 2020), augmente le risque de survenue de ces désordres métaboliques (Arsenault et al., 2017 ; Malik et al., 2010 ; et al., Ruanpeng et al., 2017).

Les boissons sucrées, à base de saccharose ou de sirop de glucose fructose, sont aujourd'hui la deuxième plus grande source de sucres libres derrière les produits composés en majeure partie de sucre tels que le sucre de table, le chocolat, les bonbons ou encore la confiture (Hu et al., 2010 ; Chatelan et al., 2019). Plusieurs études épidémiologiques récentes, ainsi qu'une méta-analyse de ces études, ont montré une association positive entre la consommation d'au moins un verre (250mL) de boisson sucrée par jour et l'augmentation de la mortalité totale (de 4 à 14%) et CV (de 8 à 19%), indépendamment de la fréquence de consommation, de l'âge, du sexe et de l'existence de facteurs de risques CV (indice de masse corporelle (IMC), hypercholestérolémie et hypertension notamment) (Malik et al., 2019, Mullee et al., 2019 ; Yin et al., 2020, Qin et al., 2020). De la même façon, les méta-analyses d'études observationnelles confirment le fait que la consommation de boissons sucrées conduit à l'augmentation de 12 à 18% le risque de survenue de l'obésité et de 19% le DT2 (Qin et al., 2020, Ruanpeng et al., 2017). De plus, des études montrent une corrélation entre l'augmentation du risque de survenue de certaines maladies circulatoires et la consommation de boissons sucrées dans la population générale. En effet, ce risque augmente de 10% le risque d'hypertension, de 13 à 21% le risque d'accidents ischémiques et de 22 à 26% pour les maladies coronariennes dont l'infarctus du myocarde (Qin et al., 2019 ; Narain et al., 2016 ; Pacheco et al., 2020).

De manière intéressante, l'ensemble de ces études épidémiologiques rapportent l'existence d'un sur-risque CV pouvant atteindre 21% chez les personnes consommant 2 boissons sucrées ou plus par jour, par rapport à des sujets n'en consommant pas ou peu (<1 boisson/mois, volume de la boisson entre 200 et 355mL), et augmentant de 8% par verre consommé (Mullee et al., 2019, Malik et al., 2019, Chazelas 2020, Yin et al., 2020). Au regard des altérations métaboliques et CV associées à la consommation de boissons sucrées, le remplacement de ces sucres par les édulcorants a été approuvé par les instances de santé telles que la FDA ou encore par l'EFSA.

ii. Consommation d'édulcorants et mortalité cardiovasculaire

En effet, la substitution du sucre dans les boissons par des édulcorants est vue aujourd'hui comme une alternative moins délétère pour la santé, et permettant de limiter le développement de facteurs de risques CV et l'augmentation de la mortalité totale observée lors de la consommation de sucre. L'étude du CREDOC en 2020 vient, par ailleurs, d'observer que le 1^{er} produit élémentaire à éviter est le sucre pour 42% du panel représentatif de la population française.

Néanmoins, jusqu'à très récemment, peu de données observationnelles et de suivi de cohorte étaient disponibles dans la littérature sur les effets réels de la consommation d'édulcorants. En 2019, l'étude de Malik et coll., basées sur un suivi allant de 28 à 34 ans selon les cohortes et incluant 118 363 sujets, a montré pour la première fois que l'augmentation du risque de mortalité totale et CV était limitée chez les consommateurs de boissons édulcorées par rapport aux consommateurs de boissons sucrées (7 et 13% pour la mortalité totale et CV respectivement chez les consommateurs d'édulcorants contre 21 et 31% chez les consommateurs de sucre). De plus, dans cette étude on remarque que contrairement aux boissons sucrées qui augmentent ces risques de mortalité indépendamment du sexe des individus, la consommation de boissons édulcorées affecte particulièrement et de manière significative les femmes et non les hommes et ce, uniquement lors d'une fréquence et d'un volume de consommation conséquent (>2 boissons/jour). Les auteurs suggèrent ainsi que la substitution d'une boisson sucrée par une boisson édulcorée chaque jour permettrait tout de même de réduire le risque de mortalité totale de 4% (Malik et al., 2019).

Toutefois, ces observations ne sont pas retrouvées dans les autres études de cohorte ou méta-analyses, démontrant une augmentation du risque de mortalité toute cause et CV plus importante lors de la consommation de boissons édulcorées que lors de la consommation de boissons sucrées, et ce même après ajustement des modèles statistiques pour les facteurs de risques confondants (Mullee et al., 2019, Chazelas et al., 2020, Qin et al., 2020). Cependant, les études récentes effectuées sur plusieurs centaines de milliers de participants s'accordent sur l'importance de la dose consommée dans la significativité de ces risques de mortalité totale et CV. En effet, ceux-ci semblent significativement augmentés, de 16 à 26% et de 11 à 13% selon les études respectivement, uniquement chez les sujets consommant l'équivalent de plus de 2 boissons par jour (Mossavar-Rahmani et al., 2019 ; Mullee et al., 2019 ; Chazelas et al., 2020). Sur la base de ces données, une méta-analyse publiée fin 2020 rapporte que le risque de mortalité CV augmente de 7% pour chaque boisson édulcorée supplémentaire consommée (Yin et al., 2020).

L'augmentation de la mortalité suite à la consommation de boissons édulcorées peut également être en partie expliquée par les comorbidités associées à cette consommation. En effet, les études observationnelles établissent un lien entre la consommation de boissons édulcorées et l'incidence de l'obésité et/ou du diabète. En effet, celle-ci augmentant de 21 à 59% pour l'obésité et de 15 à 33% pour le DT2 selon les études, contribue à expliquer l'augmentation de la mortalité associée chez ces consommateurs (Ruanpeng et al., 2017 ; Fagherrazzi et al., 2017 ; Qin et al., 2020). De plus, la consommation de ces boissons édulcorées a également été associée à une augmentation du risque de mortalité associé à la survenue de maladies circulatoires particulièrement (Mullee et al., 2019). En ce sens, Mossavar-Rahmani et al. ont rapporté chez la femme une association entre la consommation d'édulcorants et la survenue d'évènements ischémiques, notamment au niveau des microvaisseaux (+144%) et de maladies coronariennes (Mossavar-Rahmani et al., 2019). Néanmoins, l'observation du lien entre la consommation de boissons édulcorées et l'augmentation significative du risque de survenue de ces comorbidités n'a été observé que pour les grands consommateurs de ces boissons (>2 boissons par jour). Cependant, comme nous l'avons spécifié précédemment dans la revue de littérature sur le sucralose, il est possible que ce résultat puisse être lié à un phénomène de causalité inverse, impliquant qu'une situation de surpoids ou d'obésité amène à une consommation plus importante de produits contenant des édulcorants (Malik et al., 2019). Malgré tout, la causalité inverse ne semble pas expliquer entièrement le risque accru observé dans toutes ces études, dont la majorité ont inclus des facteurs de confusion potentiels clés en tant que covariables (Pang et al. 2021).

L'ensemble de ces données participant ainsi à alimenter le débat centré sur l'utilisation des édulcorants en tant que stratégie pour remplacer le sucre dans l'alimentation, stratégie qui semble à considérer uniquement pour les grands consommateurs et dans le cadre d'une consommation raisonnée. Néanmoins, au-delà de ces observations cliniques, la compréhension des mécanismes biologiques associés à la consommation d'édulcorants semble essentielle afin de mieux comprendre les effets sur la santé humaine, notamment sur le plan métabolique et CV. La figure 16 ci-dessous résume les principaux résultats des différentes études épidémiologiques (Fig. 16).

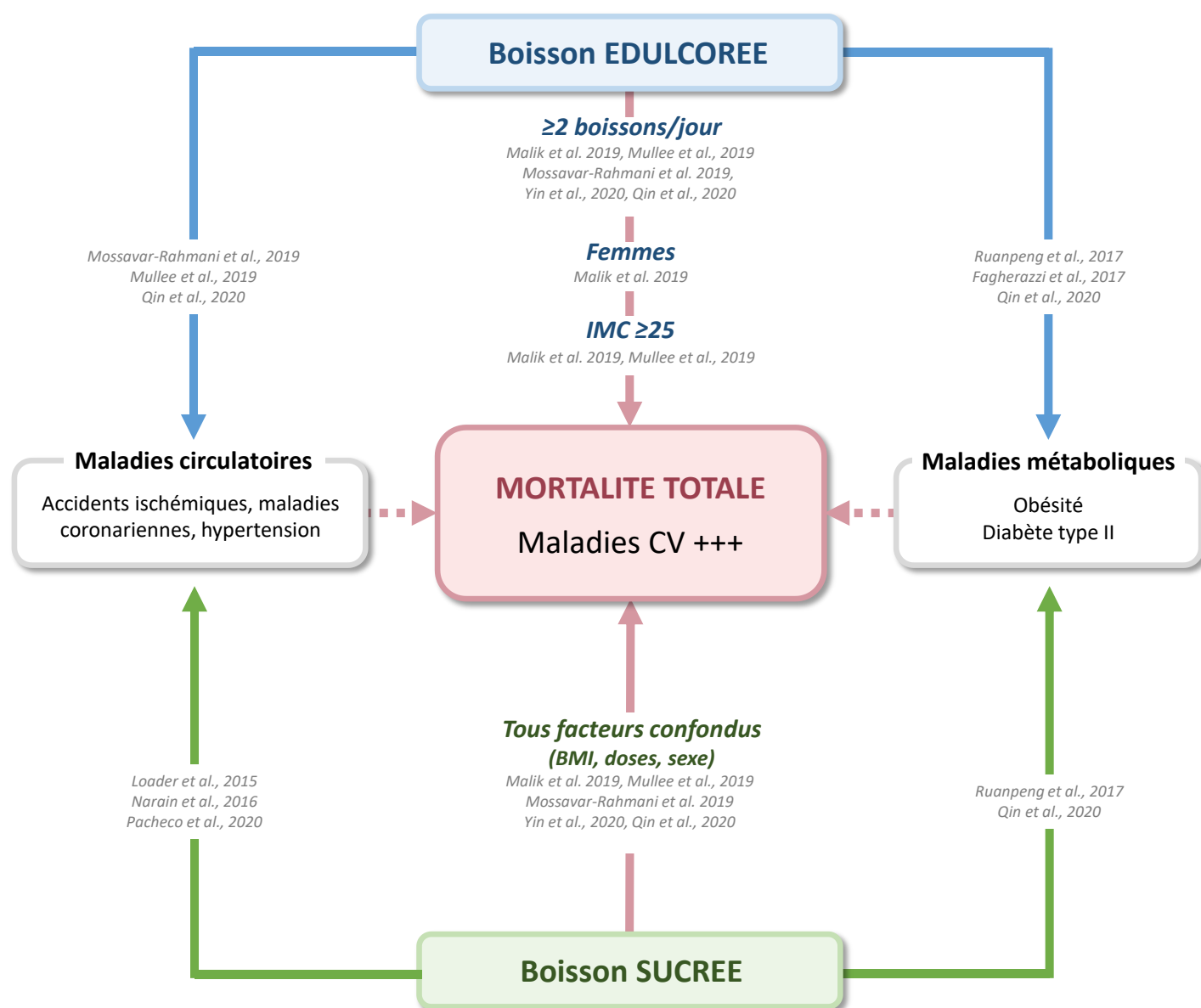


Figure 16 : Bilan des données épidémiologiques disponibles sur les effets de la consommation de boissons sucrées ou édulcorées sur le risque de mortalité totale et cardiovasculaire.

b. Sucre et réponses biologiques : rôle dans le développement de facteurs de risques cardiovasculaires

L'ingestion de nourriture, et notamment de sucre, déclenche une réponse hormonale complexe, dont le but est, entre autres, de minimiser les oscillations de la glycémie grâce à une stimulation appropriée du captage de glucose par le foie et les tissus musculaires et adipeux. Toutefois, lors d'une consommation importante de sucre, ces systèmes subissent des perturbations qui peuvent être à l'origine de dysfonctions métaboliques pouvant également avoir un impact à l'échelle CV.

i. Complications métaboliques

Surcharge pondérale et obésité

Lors d'un apport énergétique adapté et dans le cas où cela est nécessaire, le tissu adipeux accroît ses capacités de stockage en augmentant la taille de ses adipocytes. La transformation et le stockage du glucose sous forme de triglycérides se fait en priorité dans le tissu adipeux sous-cutané et abdominal (extra-péritonéaux), mais peut éventuellement s'étendre aux tissus adipeux viscéraux (intra-péritonéaux) lors d'un déséquilibre de la balance énergétique. En effet, il est connu que l'augmentation des masses adipeuses viscérales est associée à la survenue de perturbations métaboliques favorisant l'insulino-résistance telles que l'augmentation de la libération d'acides gras libres dans la circulation systémique ou encore le relargage de facteurs pro-inflammatoires (Desprès et al., 2008). La consommation de boissons sucrées participe donc fortement au déséquilibre énergétique nutritionnel et a été rapportée par les études épidémiologiques et expérimentales comme étant à l'origine d'une augmentation significative de la masse corporelle (Schulze et al., 2004 ; Togo et al., 2019). Ainsi, la consommation de ce type de boisson participe à l'installation de l'obésité, pathologie caractérisée par un indice de masse corporelle ($IMC = \text{masse (kg)} / \text{taille}^2 \text{ (m)} \geq 30 \text{ kg.m}^{-2}$) et au sein de laquelle l'homéostasie métabolique des tissus adipeux est perturbée. Les sous-chapitres suivants décrivent l'altération des fonctions physiologiques qui résultent de cette perturbation.

Inflammation et dyslipidémie

Le tissu adipeux blanc est un tissu endocrine qui, en plus de sa fonction de stockage, sécrète de nombreux facteurs responsables du maintien de l'homéostasie interne. Lors de son expansion exacerbée, celui-ci est notamment à l'origine de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, conduisant à l'installation d'une inflammation chronique (Apostolopoulos et al., 2016). Cet état pathologique favorise l'insulino-résistance et la dysfonction artérielle systémique (Apovian et al.,

2008). Les études cliniques ont pu montrer, via le dosage de la protéine C-réactive qui est un marqueur de l'inflammation pro-athérogène, que la consommation de boissons sucrées favorisait le développement de cette inflammation de bas grade (Koning et al., 2012 ; Hert et al., 2014). L'environnement pro-inflammatoire du tissu adipeux chez le patient obèse est également associées à une dyslipidémie, définie par un taux de triglycérides circulants $>2,3\text{mM}$ (Lian et al., 2019). La dyslipidémie est connue pour être un facteur de risque CV et participe, elle aussi, au phénomène d'insulino-résistance chez l'obèse (Després et al., 2008).

Leptino-résistance et sécrétion d'incrétine

La leptine est une adipokine principalement sécrétée par le tissu adipeux blanc, qui régule la satiété et la dépense énergétique métabolique. Lors d'un déséquilibre dans la balance énergétique, on observe l'installation progressive de l'hyperleptinémie, en réponse à l'hyperinsulinémie stimulant le tissu adipeux. En effet, chez le sujet sain, une étude de cohorte (ENRICA) a montré que la consommation d'une boisson sucrée par jour est associée à une augmentation de 2,73% du taux de leptine dans le sang (Lana et al., 2014). Chez les patients en surpoids ou obèses, une étude interventionnelle de 8 semaines a montré une élévation du taux de leptine circulante de 10,3% après la consommation d'une boisson sucrée contenant 25% de l'apport journalier total (Rezvani et al., 2013). La sécrétion de leptine est notamment exacerbée chez les patients obèses, proportionnellement à la quantité de tissu adipeux qu'ils possèdent, conduisant à une résistance à la leptine, notamment au niveau hypothalamique, impactant de ce fait le comportement alimentaire en faveur d'une hyperphagie. L'hyperleptinémie, dont la sécrétion et l'action sont fortement altérées dans les premiers stades d'apparition de l'obésité, favorise l'installation de l'insulino-résistance et participe ainsi à l'augmentation du risque de développer un syndrome métabolique (Ceddia et al., 2005 ; Sáinz et al., 2015).

Comme nous avons pu le voir dans la revue de littérature, la régulation des taux d'incrétines est essentielle au maintien de l'homéostasie glucidique médié par la sécrétion d'insuline. Or, l'HG chronique semble affecter l'effet des incrétines sur les cellules- β sécrétrices d'insuline sans pour autant que ce phénomène soit lié à une dysfonction de ces cellules (Mari et al., 2013). En effet, chez des sujets diabétiques, bien que le profil de sécrétion des incrétines (i.e. GIP et GLP-1) soit similaire à celui des sujets sains, la potentialisation de la sécrétion d'insuline par ces hormones intestinales est diminuée, conduisant à une élévation plus importante des niveaux de glucose sanguin après un test de tolérance au glucose (Bagger et al., 2011). Dans ce sens, au niveau pancréatique, l'exposition chronique de cellules de souris à une concentration élevée de glucose (25mM) a été associée à une

baisse de l'efficacité de GLP-1 sur les récepteurs des cellules- β via l'activation de la protéine kinase A (Rajan et al., 2015). D'autre part cette inefficacité de GLP-1 est également retrouvée chez les patients obèses qui semble présenter une diminution de la sécrétion de cette hormone (Carr et al., 2010). Enfin, une étude a pu remarquer que la sur-activation du récepteur au GLP-1 cérébral a été associé à la survenue d'une insulino-résistance périphérique (Knauf et al., 2008). Bien que l'impact de ces maladies sur la fonction des incrétines ou l'inverse ne soit pas encore clair, il semblerait que des perturbations au niveau de ces niveaux d'hormones intestinales soient à même de participer au déséquilibre métabolique global induit par la consommation répétée d'un excès de sucres libres.

Hyperinsulinémie et insulino-résistance

Comme nous avons pu le voir, l'obésité joue un rôle majeur dans le développement de l'insulino-résistance, via la dérégulation du métabolisme lipidique. Celle-ci se caractérise par un trouble de l'assimilation, de l'utilisation et du stockage du glucose par les tissus cibles de l'insuline, lorsque cette hormone est sécrétée à des concentrations physiologiques. La désensibilisation progressive des récepteurs insuliniques à leur agoniste est notamment due à un environnement pro-inflammatoire et dyslipidémique, mais résulte également de la stimulation abusive des récepteurs insuliniques en réponse à l'ingestion fréquente de glucose. Afin de pallier à ce manque de réceptivité et de préserver l'homéostasie glucidique et lipidique, une hyperinsulinémie compensatrice est alors mise en place. Toutefois, lorsque l'organisme n'est plus capable de compenser l'inefficacité de l'insuline sur ces récepteurs malgré des taux de sécrétion élevés, une HG chronique s'installe, traduisant une insulino-résistance (Barazzoni et al., 2018). L'insulino-résistance en place va alors s'auto-entretenir, du fait de la dysfonction associée des organes insulino-sensibles. En effet, l'inhibition par l'insuline de l'enzyme clé de la lipolyse est levée en cas d'insulino-résistance, participant alors au relargage massif d'acides gras libres dans la circulation sanguine aggravant d'autant plus cette insulino-résistance. De même, l'action hypoglycémiante de l'insuline est altérée lors de l'insulino-résistance, levant l'inhibition de la production de glucose par le foie et empêchant la captation du glucose au niveau musculaire (Andreelli et al., 2006) (Fig. 17).

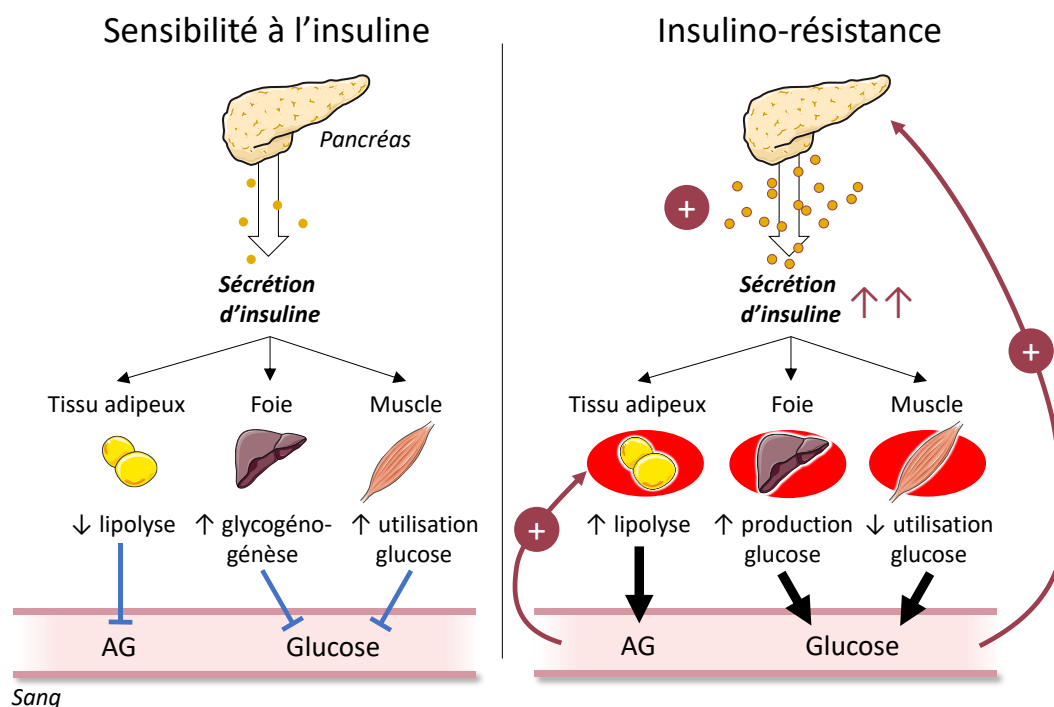


Figure 17 : Effet de la régulation de l'insuline sur ses différents tissus cibles en conditions physiologiques et pathologiques. AG : Acide gras libres

Au-delà des conséquences métaboliques provoquées par l'exacerbation du stress hyperglycémique, celui-ci est également connu pour causer des altérations vasculaires, notamment via l'altération de la composante endothéliale vasculaire (Mäkimattila et al., 1996).

ii. Complications cardiovasculaires : atteintes de la fonction endothéliale vasculaire

Parmi les nombreuses fonctions de la physiologie vasculaire, la vasomotricité apparaît comme un marqueur de choix dans l'évaluation précoce du développement des pathologies CV (Higashi et al., 2009 ; Tziomalos et al., 2010).

Rappel de physiologie vasculaire

Au sein du système vasculaire, les artères sont les vaisseaux ayant la plus grande capacité de vasomotricité grâce à leur importante proportion en cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). En effet, cette couche de CMLV agrémentée de fibres élastiques est capable de moduler le diamètre de ces vaisseaux. On appelle cette couche la média, comprise entre l'adventice plus externe, et l'intima plus interne (Fig. 18).

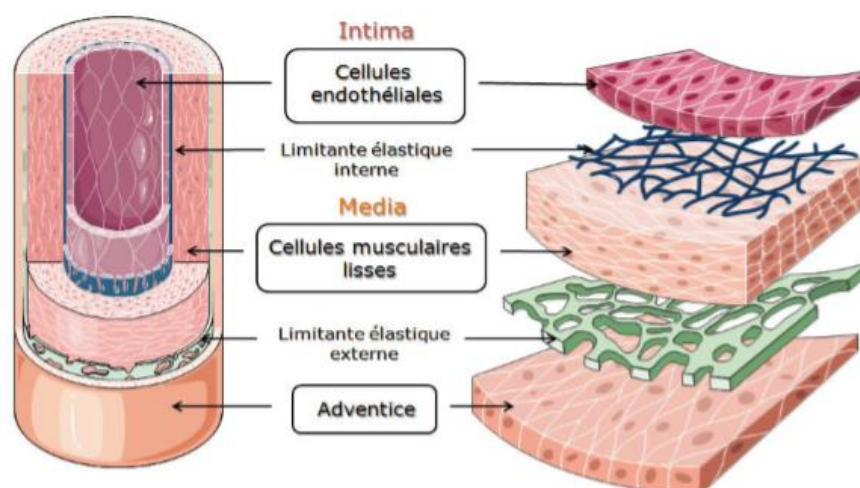


Figure 18 : Les différentes structures de la paroi vasculaire artérielle

L'activité des CMLV va pouvoir être modulée par deux types de signaux, nerveux provenant de l'adventice, et endocrine par la sécrétion de facteurs vasoactifs endothéliaux. L'adventice a un rôle nourricier pour l'artère, et prend part à sa vasomotricité par la présence de fibres ganglionnaires nerveuses d'origine sympathiques influençant le tonus vasculaire. En effet, la stimulation de ces fibres induit la libération de noradrénaline, qui agit sur deux types de récepteurs situés au niveau des CMLV : les récepteurs α -adrénergiques (α -ARs 1 et 2) et les récepteurs β -adrénergiques (β -ARs). Ainsi, la stimulation des α -ARs, principalement des α -AR1 et, dans une moindre mesure, des α -AR2 (Leech et Faber 1996), favorisera la libération de calcium intracellulaire et donc la vasoconstriction, tandis que la stimulation des β -ARs permet, au niveau vasculaire, d'induire la relaxation musculaire. La réponse vasomotrice dépendra alors de la répartition de ces récepteurs dans les différentes structures vasculaires. Ainsi, si dans la plupart des artères la réponse α -adrénergique prédomine, dans d'autres artères telles que les coronaires, la réponse β -adrénergique prend le pas sur la réponse α -adrénergique et induit une vasodilatation (Zuberbuhler et Bohr 1965).

La balance contraction / relaxation, permettant le maintien d'un tonus vasculaire adapté, est notamment régulée par les cellules endothéliales qui composent l'intima, la couche vasculaire la plus interne. En réponse aux contraintes mécaniques appliquées sur la paroi artérielle (cisaillement, contraintes radiales) ou à la présence de facteurs circulants (hormones, cytokines, nutriments), l'endothélium vasculaire exerce sa fonction endocrine et régule le tonus vasculaire, via son action sur la média. L'endothélium régule également les processus d'adhésion cellulaire, de perméabilité vasculaire, de prolifération et d'inflammation. Cette couche est donc au cœur de l'homéostasie

vasculaire. Parmi les facteurs sécrétés par l'endothélium, certains sont vasoconstricteurs (endothéline-1, thromboxane A2, angiotensine II) et d'autres vasodilatateurs (prostacycline, EDHF). De plus, l'un des rôles majeurs de l'endothélium dans la préservation de la fonction vasculaire réside dans sa capacité à produire un gaz lipophile aux propriétés vasorelaxantes, le NO, qui se diffuse rapidement à travers les membranes cellulaires et induit la relaxation des CMLV.

Hyperglycémie aiguë et dysfonction endothéliale

Il a été montré chez l'homme que l'HG aiguë causée par la consommation d'une boisson sucrée ou de glucose provoque une perte des capacités vasodilatatrices médiées par l'endothélium, en comparaison avec la consommation d'eau. Pour autant, ces effets n'apparaissent que de manière transitoire (Loader et al., 2017 ; Loader et al., 2015). Cette altération semble être causée par l'importante production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) au niveau vasculaire (Loader et al., 2017 ; Mah et al., 2011 ; Mah et al., 2012). En effet, la production d'EROs au niveau endothélial est connue pour affecter la production et l'efficacité d'action du monoxyde d'azote (NO) sur la composante vasculaire, limitant ainsi la capacité de relaxation de cette dernière (Schulz et al., 2011). De plus, ce phénomène est d'autant plus accentué que la biodisponibilité du NO est diminuée lors de la surproduction d'anion superoxyde. En effet, dans ces conditions l'anion superoxyde peut s'associer avec le NO pour former l'anion peroxynitrite (ONOO^-), exacerbant la dysfonction endothéliale (Giugliano et al., 1997 ; Du et al., 2001) (Fig. 19).

La répétition de ces excursions hyperglycémiques excessives, comme pourrait l'être une consommation fréquente de boissons sucrées, est un facteur participant à l'installation progressive de l'HG chronique et de l'insulino-résistance qui y est associée.

Tout comme l'HG aiguë, l'HG chronique est à l'origine d'une production de EROs exacerbée au niveau endothélial, causant la dysfonction de cette composante et altérant la vasomotricité (Mäkimattila et al., 1996). Parmi les acteurs à l'origine de cette surproduction d'EROs endothéliales en condition d'HG, on peut citer l'enzyme NADPH oxydase et la chaîne mitochondriale comme les deux principales sources de ce stress oxydant (Brandes et Kreuzer 2005 ; Nishiwaka et al., 2000 ; Suzuki et al., 2011) (Fig. 19). D'autre part, l'insulino-résistance des tissus entrave la relaxation vasculaire endothéliale-dépendante en empêchant l'activation de la eNOS par l'insuline (Devos et al., 2008). Ce phénomène conduit à un déséquilibre en faveur de la composante sympathique contractile et favorise ainsi le développement de l'hypertension artérielle, facteur de risque CV (Stas et al., 2004).

La principale différence entre l'impact vasculaire de l'HG chronique et celui de l'HG aiguë

réside dans l'augmentation de la perméabilité et de la rigidité vasculaire, via l'interaction des produits terminaux de la glycation (AGEs) avec les CMLV. En effet, l'état pro-oxydant causé par la chronicité de ce stress hyperglycémique favorise la production des AGEs, perturbant ainsi la perméabilité endothéliale et participant à la rigidification des vaisseaux (Zieman et al., 2005 ; Zhang et al., 2017 ; Rom et al., 2020). De plus, la fixation des AGEs au niveau de la paroi vasculaire est connue pour accélérer le développement de la plaque athérosclérotique, accentuant de ce fait le risque de survenue de complications CV (Wen et al., 2002 ; Hink et al., 2003 ; Basta et al., 2004) (Fig. 19).

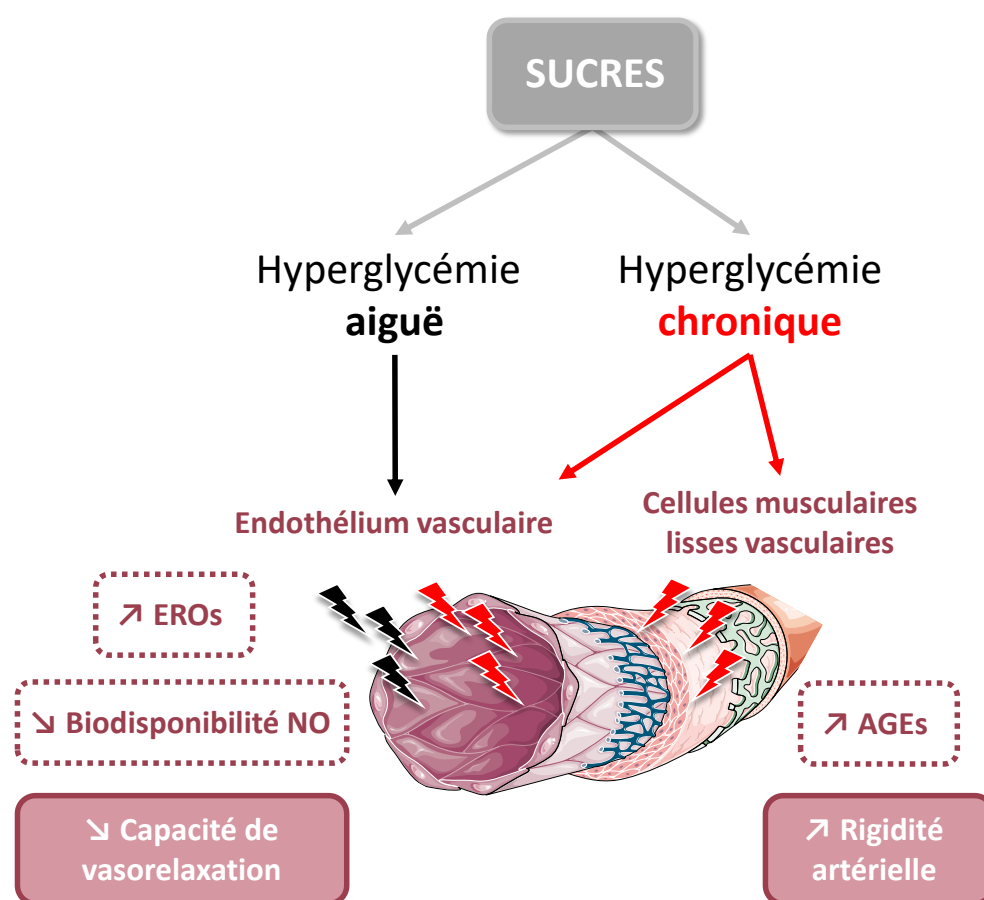


Figure 19 : Effet de la consommation aiguë de boisson sucrée sur la fonction vasculaire. Reproduit de Loader et al., 2017. EROs : Espèces réactives de l'oxygène ; AGEs : Advanced Glycation Products ; NO : Nitric Oxide

Perturbations métaboliques et dysfonction endothéliale

Parmi les différentes complications métaboliques énoncées ci-dessus, certaines ont un impact majeur sur la fonction endothéliale et vasculaire. En effet, l'insulino-résistance conduit à une HG chronique à l'origine de mécanismes délétères pour la fonction vasculaire comme nous avons pu le voir précédemment, et est associé à l'apparition plus fréquente de maladies CV (Adeva-Andany et al., 2019). La leptine joue également un rôle sur la régulation du tonus vasculaire. En effet, en condition physiologique, elle active au niveau de ces cellules endothéliales, la voie AMPK/Akt, responsable de l'activation de la eNOS via la phosphorylation de sa sérine 1177 (Procopio et al., 2009). Toutefois, en condition d'obésité ou de syndrome métabolique, la perte de sensibilité du récepteur à la leptine entraîne l'absence d'effet de cette hormone sur l'endothélium vasculaire et favorise ainsi une vasoconstriction pathologique (Beltowski, 2006). De plus, une étude sur des cellules endothéliales de coronaires humaines a montré l'augmentation de la production de facteurs pro-inflammatoires, en présence de leptine à haute concentration (Singh et al., 2007). Cette inflammation ainsi que le stress oxydant causé par la sur-sécrétion de leptine et de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*) et l'IL-6 (interleukine-6) par le tissu adipeux, favorise l'expression de molécules d'adhésions au niveau vasculaire, participant à la dysfonction endothéliale et la formation de plaques d'athérome (Lastra et al., 2006). Ces facteurs inflammatoires inhibent également la sécrétion d'adiponectine par le tissu adipeux (Sánchez-Muñoz et al., 2005). La diminution de cette cytokine adipocytaire, connue pour limiter la production de d'EROs et le développement de la plaque d'athérome au niveau vasculaire par la stimulation de la production de NO endothélial, conduit à l'altération de cette fonction vasculaire (Ouedraogo et al, 2007 ; Recasens et al., 2004). Un autre élément dont la perturbation est associée à des complications vasculaire est l'adiponectine. En effet, l'adiponectine est une cytokine libérée par le tissu adipeux et par le *Perivascular adipose tissue* (PVAT), ayant des propriétés bénéfiques pour l'organisme et plus particulièrement au niveau vasculaire où elle peut se fixer via des récepteurs localisés au niveau des muscles lisses et de l'endothélium (Zhu et al., 2008 ; Hug et al., 2004). Tout comme la leptine elle est en mesure d'activer la eNOS et limite la production d'EROs en agissant notamment sur la NADPH oxydase, préservant ainsi la santé vasculaire (Hattori et al., 2003 ; Chen et al., 2003 ; Antonopoulos et al., 2015). Elle agit également comme un anti-inflammatoire. Toutefois, en condition d'obésité ou de DT2 la concentration d'adiponectine plasmatique est diminuée et cette diminution est associée à l'insulino-résistance et à la baisse de fonction vasculaire (Weyer et al., 2001 ; Tan et al., 2004).

En conclusion, il apparaît donc que les effets cardiométaboliques causés par la consommation ponctuelle ou régulière de sucres en excès augmentent le risque de survenue des maladies CV, en

perturbant notamment le système de régulation du glucose et des lipides. Chez les patients atteints d'obésité et de diabète les conséquences de cette consommation importante de boissons sucrées sont d'autant plus marquées qu'elles augmentent le risque de mortalité CV et toute causes (Malik et al., 2019 ; Mullee et al., 2019).

Bien que les études interventionnelles chez l'homme et l'animal permettent d'expliquer les données épidémiologiques associant la consommation de sucre avec l'augmentation du risque de mortalité CV, les mécanismes expliquant l'élévation de ce risque suite à la consommation d'édulcorant ne sont pas clairs. Ainsi, il semble essentiel de s'intéresser aux effets de la consommation de boissons édulcorées sur les paramètres métaboliques et CV pour lesquels différentes études ont mis en évidence une sensibilité à la consommation de sucre.

c. Rôle biologique des édulcorants dans le développement de facteurs de risque cardiovasculaire

Une limite majeure des études observationnelles présentées préalablement, outre le fait de ne se focaliser que sur les boissons et non sur l'alimentation en général, est l'absence de précisions sur les différentes molécules et le type d'édulcorants utilisés. En effet, il est important de considérer que les effets biologiques et les réponses métaboliques pourraient dépendre du type de molécule édulcorante étudié. Justement, quelques publications récentes semblent observer des effets propres à chaque molécule et soulignent l'importance de les considérer individuellement et non dans un ensemble (Higgins et Mattes, 2019 ; Sánchez-Tapia et al., 2019 ; Pepino, 2018 ; Sylvetsky et al., 2016 ; Pang et al., 2021). De plus, l'association de ces molécules entre elles, ayant pour but de créer un effet de synergique de leur potentiel sucrant, suggère que chaque combinaison d'édulcorants pourrait également être à l'origine d'effets spécifiques sur le métabolisme.

Un autre point majeur participant à la difficulté d'établir un diagnostic clair sur les effets des édulcorants en général ou spécifique à chacun réside dans les conditions dans lesquelles ces molécules sont testées.

En effet, bien que plusieurs études montrent que la prise d'édulcorants seule n'induit pas de réponse métabolique, il semblerait que l'association de ces molécules avec un apport calorique (glucose) dans les protocoles de mesures métaboliques pourrait être à l'origine d'une potentialisation de la réponse métabolique au glucose. Ce point a d'ailleurs fait l'objet d'un commentaire que nous avons rédigé en réponse à l'article de Nichol et collaborateurs (Nichol et al., 2018), qui montrait une absence d'effet des édulcorants sur la variation de la glycémie à jeun chez des volontaires normo-pondérés. Au travers de ce commentaire, nous avons souhaité réévaluer le protocole expérimental

décrit, conduisant à une absence d'effet des édulcorant sur la variation de la glycémie (Risdon et al., 2018). Ce commentaire rejoint l'analyse publiée dans la revue de Tucker et Tan (Tucker et Tan, 2017) appuyant le fait que l'absence de stress calorique ne permet pas d'observer les éventuels effets médiés par les édulcorants au niveau métabolique.

Cela est d'autant plus intéressant que dans la réalité clinique les édulcorants sont souvent accompagnés d'une prise calorique (au cours d'un repas par exemple). Cela suggère d'une part que le traitement post-prandial du sucre et des édulcorants dans le même temps pourrait influencer la réponse métabolique différemment de l'ingestion de sucres libres seuls ou édulcorants seuls et d'autre part que la consommation d'édulcorant seul pourrait influencer la gestion d'un apport en sucres ultérieur (Tucker et Tan, 2017 ; Risdon et al., 2018).

Bien que ces agents sucrants (e.g. le sucre et les édulcorants) ne présentent pas les mêmes caractéristiques nutritionnelles, ils ont pour points commun de permettre l'activation de récepteurs gustatifs spécifiques, eux-mêmes en lien avec le déclenchement de réponses métaboliques. On peut alors se questionner sur l'impact de l'activation de ces récepteurs par les édulcorants dans la régulation du glucose et dans le développement des maladies cardiométaboliques.

Ainsi, comme nous avons pu l'évoquer précédemment, nous nous sommes intéressés aux effets spécifiques de l'Ace-K et du sucralose, de manière isolée ou associée entre eux, sur la santé cardiométabolique afin de mieux comprendre les potentiels mécanismes pouvant expliquer les données épidémiologiques.

i. Le sucralose

Le sucralose occupe une place majeure sur le marché mondial des édulcorants et son utilisation ne cesse de progresser chaque année dans l'industrie alimentaire. Nous présentons ici une revue de littérature acceptée en décembre 2020 dans *Advances in Nutrition* et s'intéressant aux effets du sucralose sur la santé cardiométabolique. En tenant compte de l'implication des récepteurs au goût sucré et amer dans les effets médiés par cet édulcorant, nous avons identifié dans cette revue les études cliniques et expérimentales recensant les effets du sucralose dans la survenue de facteurs de risque pouvant favoriser l'apparition de complications métaboliques et CV.

Sucralose and Cardiometabolic Health: Current Understanding from Receptors to Clinical Investigations

Sydney Risdon,¹ Sylvain Battault,¹ Alonso Romo-Romo,² Matthieu Roustit,^{3,4} Loïc Briand,⁵ Grégory Meyer,¹ Paloma Almeda-Valdes,² and Guillaume Walther¹

¹Avignon University, LAPEC EA4278, Avignon, France; ²Department of Endocrinology and Metabolism, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México City, México; ³Université Grenoble Alpes, Inserm U1042, Grenoble, France; ⁴Grenoble Alpes University Hospital, Clinical Pharmacology, Inserm CIC1406, Grenoble, France; and ⁵AgroSup Dijon, INRAE, Université de Bourgogne Franche-Comté, CNRS, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France

ABSTRACT

The excess consumption of added sugar is consistently found to be associated with weight gain, and a higher risk of type 2 diabetes mellitus, coronary heart disease, and stroke. In an effort to reduce the risk of cardiometabolic disease, sugar is frequently replaced by low- and null-calorie sweeteners (LCSs). Alarming, though, emerging evidence indicates that the consumption of LCSs is associated with an increase in cardiovascular mortality risk that is amplified in those who are overweight or obese. Sucralose, a null-caloric high-intensity sweetener, is the most commonly used LCS worldwide, which is regularly consumed by healthy individuals and patients with metabolic disease. To explore a potential causal role for sucralose in increased cardiovascular risk, this present review summarizes the preclinical and clinical data from current research detailing the effects of sucralose on systems controlling food intake, glucose homeostasis, and gut microbiota. *Adv Nutr* 2021;00:1–14.

Keywords: sucralose, low-calorie sweetener, sweet and bitter taste receptor, taste signaling cascade, cardiovascular health, glucose metabolism

Introduction

Low-calorie sweeteners and cardiometabolic risk

The burden of obesity and cardiometabolic disease has increased worldwide over recent decades (1–3). Cardiovascular events remain the single leading cause of death, accounting for ~31% of global mortality rate in people with obesity and/or type 2 diabetes (4, 5). Although the development of metabolic abnormalities, including obesity and insulin resistance (6), is driven by a series of complex physiological

and lifestyle interactions, excess added sugar consumption has long been considered a prominent dietary mediating factor (7).

In recognition of the adverse health impact of high-energy added sugars, low-calorie sweeteners (LCSs) have become more commonly used in foods and beverages. By providing consumers with products that have a sweet taste and low energy content, LCSs appear to be the silver bullet in enhancing weight loss and reducing cardiometabolic disease rates (8–11). However, meta-analyses of observational studies reveal an increase in body weight, BMI, and the incidence of type 2 diabetes in people consuming LCS beverages (12). Additionally, 3 large cohort studies from Europe and the United States demonstrate an increase in all-cause mortality in those consuming ≥ 2 glasses of LCS beverages per day (13–15). This appears to be mainly driven by cardiovascular deaths, as confirmed in a very recent meta-analysis (16), especially in participants with either a BMI ≥ 25 (13) or ≥ 30 kg/m² (15). However, the interpretation of these findings is complicated, mainly due to the uncontrolled nature of the observational study design and/or by potential reverse causation (i.e., LCSs are typically

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR #19-CE21-0003-01, to GW), Fondation Francophone pour la Recherche sur le Diabète (to GW), Avignon Université (to GW), and Conseil Régional Provence-Alpes-Côte d'Azur (to SR).

Author disclosures: The authors report no conflicts of interest.

Supplemental Tables 1–4 are available from the "Supplementary data" link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at <https://academic.oup.com/advances>.

SR, SB, and AR-R contributed equally to this work.

Address correspondence to LP-EC (e-mail: guillaume.walther@univ-avignon.fr).

Abbreviations used: acesulfame-K, acesulfame potassium; ADI, acceptable daily intake; EC₅₀, half-effective concentration; GLP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GLP-1, glucagon-like peptide 1; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; HOMA-%B, homeostasis model assessment of β -cell function; HOMA-%S, homeostasis model assessment of insulin sensitivity; LCS, low-calorie sweetener; OGTT, oral-glucose-tolerance test; PLC, phospholipase C; PYY, peptide tyrosine tyrosine; SGLT-1, sodium glucose cotransporter 1; SREBP-1, sterol regulatory element-binding protein 1; TAS1R, taste receptor type 1; TAS2R, taste receptor type 2.

consumed by individuals already suffering from obesity or cardiometabolic conditions). In addition, reports of exposure to LCSs could be incomplete and/or inaccurate; and the nature of the foods and beverages containing LCSs, as well as LCSs themselves, might dramatically change over the period of follow-up of these cohorts. Finally, most studies focused on the consumption of beverages, which is not the only source of LCSs. Despite these limitations, the epidemiological evidence is consistent across studies and, thus, the commonly held belief that LCSs are physiologically neutral can be challenged.

The recognition of sucralose as a major player among LCSs

LCSs are categorized into different groups according to their origin (e.g., natural or artificial), their sweetness potency, and their nutritional value (caloric or noncaloric; and digestibility) (17, 18). Natural sweeteners include the monk fruit (*Siraitia grosvenorii*), swingle fruit extract, stevia, and the sweet-tasting protein, thaumatin. The most common artificial sweeteners are acesulfame potassium (acesulfame-K), advantame, aspartame, neotame, saccharin, and sucralose. The latter is the most commonly used artificial sweetener worldwide, accounting for 30% of the US\$2.29 billion global LCS market in 2016 (19). Although aspartame has been widely used in LCS beverages, more and more diet drinks now contain sucralose in their recipe, with an increase of 10% in sucralose-sweetened diet beverages between 2008 and 2016 (20). Sucralose is a semisynthetic sweetener that is derived from a chemical modification of sucrose, whereby the 3 hydroxyl groups are substituted by chlorine atoms (at the 4', 1', and 6'-positions). Sucralose is ~600 times sweeter than sucrose, with a quality and temporal profile very close to that of sucrose (18). The FDA and European Food Safety Authority have both approved sucralose, setting an acceptable limit of consumption [e.g., acceptable daily intake (ADI) of 5 and 15 mg/kg/d, respectively], for use in a variety of foods including baked goods, beverages, chewing gum, gelatins, and frozen dairy desserts. Thus, sucralose is considered safe for human consumption (21), partly because of its zero-calorie characteristic, which means that blood glucose concentrations are not significantly altered after consumption (22). The consumption of LCSs has even been recommended by health authorities as part of a weight loss strategy in overweight and obese individuals, as well as in people with glucose intolerance or diabetes and in those who are pregnant (23, 24). Moreover, sucralose is also consumed indirectly in pharmaceutical drugs and is even detected in the breast milk of lactating women, even among women who had not reported any LCS consumption (25). Despite the apparent neutral effects of sucralose on blood glucose and/or body weight (23, 26), consideration of the evidence from the recent observational and epidemiological studies described above, as well as the statistics demonstrating that sucralose consumption is increasing, warrants a need to question the physiological inactivity of sucralose and the potential long-term effects it might have on cardiovascular and metabolic human health (27–30).

Thus, the purpose of this review is: 1) to summarize the current understanding of sucralose molecular sensors; and 2) to review recent clinical and preclinical data related to sucralose-mediated effects on glucose metabolism and the cardiovascular system, exploring a potential causal role of sucralose consumption in the increase in cardiovascular risk.

Sucralose: Its Receptors and Signaling Pathways

The most evident effect of sucralose is its generation of a sweet sensation via stimulation of the mechanisms for sweetness perception. In the early 2000s, starting with a discovery by Nelson and collaborators (31), several studies reported that sweet-tasting compounds (e.g., natural sugars, artificial and natural null-caloric sweeteners) were detected by a single sweet-taste receptor expressed on the apical membranes of the taste receptor cells residing in the taste buds of the oral cavity (Figure 1). The sweet-taste receptor is a heterodimeric class C G-protein-coupled receptor composed of TAS1R2 (taste receptor type 1, member 2) and TAS1R3 (taste receptor type 1, member 3) subunits (32). Knockout mice studies and cellular assays have established that the heterodimeric TAS1R2/TAS1R3 is the primary sweet-taste receptor (31, 33, 34). These proteins consist of a 7-transmembrane-helix connected by a short cysteine-rich linker to a Venus flytrap domain. Natural monosaccharides and disaccharides, as well as artificial sweeteners such as sucralose, bind to the Venus flytrap domain of the TAS1R2 and/or TAS1R3 subunits (17, 35). Although glucose can activate TAS1R2/TAS1R3 at very high concentrations (>300 mM), most LCSs are much more powerful agonists with lower concentrations (<100 μ M) being sufficient for activation of these taste receptors (36). Indeed, solutions containing concentrations of sucralose in the micromolar range [half-effective concentration (EC_{50}) = 39 μ M] are sufficient to activate TAS1R2/TAS1R3 (37). In taste bud cells, the signaling cascade involves the activation of the heterotrimeric G-protein, α -gustducin, and subsequent stimulation of phospholipase C (PLC) β 2. This leads to a calcium-dependent activation of the transient receptor potential cation channel M5, which results in membrane depolarization, opening of Pannexin-1 and, ultimately, a release of ATP. In turn, extracellular ATP excites primary afferent sensory fibers, stimulating them to send a sweet taste signal to the brain (36, 38–40).

Additionally, sensory studies conducted in humans and preference tests conducted in rodents have shown that sucralose has a bitter taste quality (41). Cellular assays using human embryonic kidney 293 cells have demonstrated that this off-taste is due to the capacity of sucralose to activate several human bitter taste receptors named TAS2Rs (taste receptors type 2). The human TAS2R family, which also belongs to the G-protein-coupled receptor superfamily, encompasses ~25 members possessing different ligand profiles. TAS1Rs and TAS2Rs share the same signaling cascade. Sucralose has been shown to activate the human TAS2R1, 10, 31, 44, and 46 (EC_{50} = 16–60 mM) (42).

Since first being discovered in the mouth, taste receptors have subsequently been demonstrated to be expressed in

RECEPTORS SENSITIVE TO SUCRALOSE STIMULATION

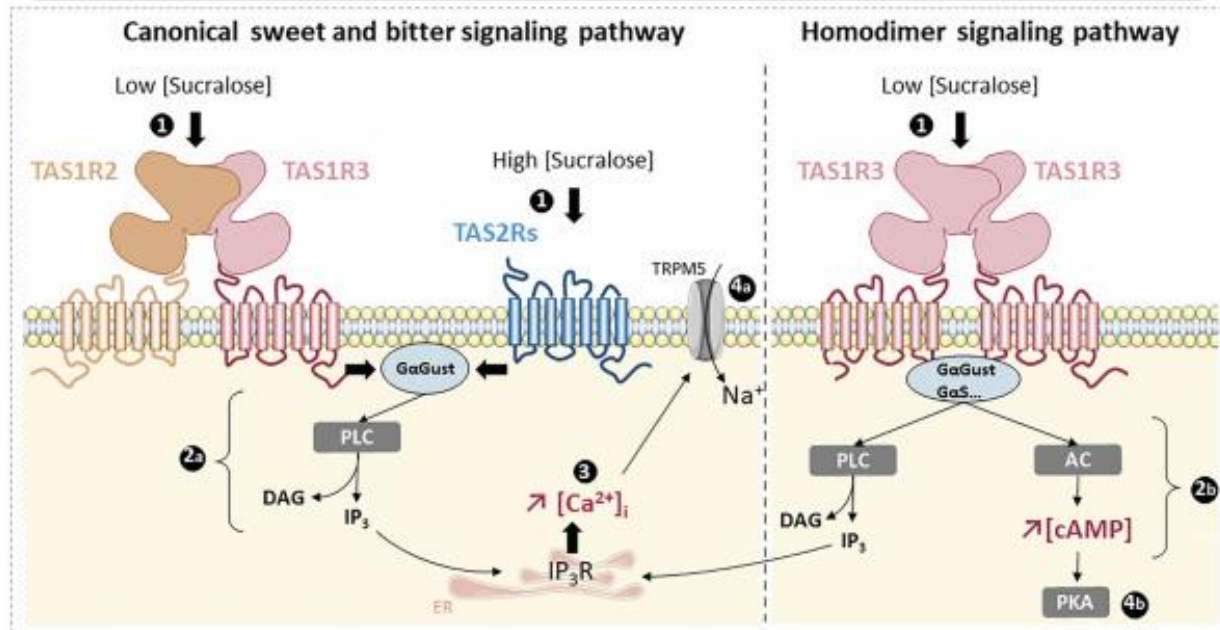


FIGURE 1 The effect of sucralose on sweet and bitter taste receptors with the associated signaling pathways. Description of the signaling pathways being activated following the binding of sucralose to bitter receptors (TAS2Rs), sweet taste receptors, or the TAS1R3 homodimer. (1) The interaction between sucralose and its receptor is associated with the activation of (2) signaling cascades involving (2a) PLC activation or (2b) both PLC and AC activation. PLC activation leads to an increase in intracellular IP_3 , which will interact with its receptor, IP_3R , localized in the ER. It also induces (3) a release of intracellular calcium, which (4a) activates TRPM5. The subsequent entrance of sodium to the cell via TRPM5 allows membrane depolarization and nervous perception of a bitter or sweet taste. Alternatively, activation of AC increases cAMP production and PKA activation with (4b) various consequences for the cell type in which the process occurs. AC, adenylate cyclase; $[Ca^{2+}]_i$, intracellular calcium; DAG, diacylglycerol; ER, endoplasmic reticulum; GαGust, G-protein α -gustducin; GαS, G-protein α s subunit; IP_3 , inositol triphosphate; IP_3R , inositol triphosphate receptor; PKA, protein kinase A; PLC, phospholipase C; TAS1R2/3 and TAS1R3/3, sweet taste receptor; TAS2R, bitter taste receptor; TRPM5, transient receptor potential cation channel subfamily M member 5.

numerous nongustatory systems. In some tissues (e.g., gut, pancreas, brain, and adipose tissues), both TAS1R2 and TAS1R3 are functionally expressed. However, in some other tissues (e.g., the stomach, liver, lymphocytes, kidney, lung, and, probably, the endothelium), TAS1R3 are only expressed as the monomeric subunit, most likely in a homodimeric form (31, 43). Cellular assays have shown that TAS1R3 alone (i.e., in absence of TAS1R2) has a low sensitivity to monosaccharides and disaccharides (43). Despite a lack of evidence, it has been thought that the TAS1R3 homodimer could be involved in the detection of sucralose. Additionally, numerous TAS2Rs, including several sucralose-sensitive isoforms, have also been found in other tissues including the heart and vascular wall (44–46).

In these other tissues, stimulation of the sweet taste receptor, TAS1R2/TAS1R3, and bitter taste receptor, TAS2R, by sucralose or any other LCS has been largely associated with activation of the canonical pathway, initially identified in the taste buds (i.e., Gα-gustducin/PLCβ2/inositol triphosphate pathway) (Figure 1, left panel). However, recent literature also suggests that taste receptors can trigger alternative signaling pathways. In this context, Nakagawa

and collaborators (47, 48) provided evidence that LCSs act as biased agonists toward TAS1R3 (i.e., they can activate distinct signaling pathways) in mouse insulinoma 6 cell types (Figure 1, right panel). For example, in these cells, the interaction of sucralose, acesulfame-K, or Na-saccharin with TAS1R3 results in a distinct activation of the PLC and/or the adenylate cyclase pathways and, thus, in a different pattern of response for changes in intracellular calcium and/or cAMP concentrations.

Beyond the oral cavity and the initiation of sweet sensation, there is accumulating evidence that taste receptors act as a nutrient sensor and have a role in metabolic control. Findings that detail evidence for their role in glucose intestinal absorption, metabolism, and cardiovascular functions (44–46) have provided the basis for developing new therapeutic strategies (49) and/or for clarifying the aforementioned concerns associated with the habitual consumption of LCSs (which will be partly discussed in the next sections). However, because most of the effects of LCSs have been observed in vitro, it is not completely clear whether their action on taste receptors translates into physiological modifications in habitual consumers. Indeed, there are reasons to doubt

that sucralose activates taste receptors in certain organs. Although the pharmacokinetics of sucralose have scarcely been explored, previous research has indicated that its oral bioavailability is very low, close to 14% (50). This seems to be specific to the sucralose molecule, because other LCSs commonly used in the food and beverage industry, such as acesulfame-K or saccharin, are absorbed at a rate of 80–100% into the plasmatic compartment (51) and, thus, are more likely to amount to a plasmatic concentration adequate for the activation of TAS1Rs. However, sucralose plasma concentration is largely dependent on gastrointestinal permeability (52–56), which could be increased in conditions such as obesity and diabetes (57, 58). Finally, little is known about the distribution of sucralose in nondigestive tissues, a gap in the knowledge that needs to be addressed to better understand the effect of sucralose consumption on human health (Supplemental Tables 1–3).

The Effects of Sucralose on Glucose Metabolism and the Cardiovascular System

Appetite and taste preferences

Multiple systems contribute to the control over what and how much we eat. Looking at the interaction of LCSs with these systems could thus provide an entry into understanding whether and, eventually how, each LCS affects eating behaviors. Unsurprisingly, many research efforts have been made to characterize the impact of LCSs on taste perception and, of course, how to refine it. It is, indeed, commonly accepted that the sense of taste guides essential appetitive behaviors through its action on neural mechanisms that elaborate reward and aversion. Findings obtained using laboratory rodent models demonstrate that by manipulating the brain fields that represent sweet taste, it is possible to directly control the animal's internal representation, sensory perception, and behavioral actions (i.e., sugar appetite) (59). In humans it is thought that chronic stimulation of similar reward-related systems by highly palatable food, such as sugar, can override homeostatic signals and eventually lead to overeating and subsequent obesity (60). In line with this theory, behavioral tests show that when given the choice between a sugar solution and water, rodent models, even when replete, increase their fluid intake by consuming almost exclusively the sugar solution (61). Interestingly, when sugar is substituted with an LCS, comportment and attraction to sweeter elements is similar (62). However, discrepancies in perceived taste are reported between each LCS and thus different hedonic responses are induced. Most LCSs interact with TAS2R and elicit a bitter side taste that is particularly evident in high concentrations. Several clinical reports indicate that sucralose has a relatively low bitterness compared with saccharin or acesulfame-K and thus provides a more acceptable sucrose-like taste quality (63, 64). As previously mentioned, sweet taste perception is peripherally mediated by TAS1R2/TAS1R3, which recognize both sugar and sweeteners. Surprisingly, ageusic animals—in which the sweet receptors have been inhibited—still

develop a preference for sugar over time, but not for sweeteners, indicating that sugar can recruit additional reward mechanisms (33, 65, 66). Consistent with this, clinical brain imaging data also indicate that sucrose and sucralose both activate taste-reward circuits, but responses to sucrose appear to be greater in intensity and involve additional brain areas related to pleasure (67). The available data suggest that an attraction and preference for sweeter elements involves the integration of both orosensory and post-ingestion signals. Recently, Zuker's team (68) identified a gut-to-brain neuronal circuit that communicates the presence of sugar to the brain and drives the preference for sugar. This postoral recognition system relies on the sodium-glucose cotransporter (SGLT), which only reacts with some hexoses (e.g., glucose, galactose), but does not recognize any of the LCSs. This last observation might explain why sucrose and glucose are more "rewarding" than sucralose (or other sweeteners) after prolonged exposure (68–70). The dominant paradigm in the regulation of feeding suggests that 2 parallel systems interact to influence food consumption, the previously cited hedonic system and the homeostatic system. The homeostatic system relies on the activity of several hormonal regulators such as leptin, ghrelin, insulin, glucagon-like peptide type 1 (GLP-1), and peptide tyrosine-tyrosine (PYY), which inform the brain about peripheral energy levels. When ingested, carbohydrates stimulate the secretion of these hormones in the gut and thereby send a satiety signal. Several *in vitro* studies have reported that GLP-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) secretions in the enterocyte are controlled by the sweet receptor TAS1R2/TAS1R3 and, correspondingly, that sucralose is a potent stimulus for their secretion (71, 72). Although animal and clinical studies reported no change in leptin concentration after sucralose consumption, ghrelin seems to be affected by this molecule. *In vivo* and clinical studies, however, provide contrasting results (73–76). The significance of such mechanisms for appetite and the regulation of food consumption warrants further investigation.

Body composition

The use of LCSs is often proposed as a strategy to promote weight loss or for weight maintenance. However, as recently reviewed by Hunter et al. (23), a meta-analysis of epidemiological data mostly reported a positive or a lack of association between the consumption of LCSs and body weight (12, 77, 78). In contrast, meta-analyses of randomized controlled trials tend to show no, or only a small, negative association between LCS consumption and body weight (12, 77–80), but there are no available secondary analyses of the specific effect of sucralose. One of the major arguments proposed to explain these epidemiological findings is the possibility of reverse causation (81). Interventional research also provides mixed findings. It is likely that this results from the fact that studies differ largely in duration and in the population studied (e.g., by age, gender, health status, and weight). Also, as pointed out by Higgins et al. (8), LCSs are often studied in combination (differing in composition between studies),

despite the fact that LCSs might not all be equal when it comes to weight management. To address this point, Higgins and collaborators conducted a randomized controlled trial to compare the effects on body weight of 4 LCSs with sucrose. After 12 wk, sucrose and saccharin consumption yielded a significant and comparable increase in body weight, whereas there was no change in body weight in those consuming aspartame, rebaudioside A, and sucralose. The body weight of those consuming sucralose even tended to decrease and was significantly lower than that in those consuming any other sweetener. Hence, this trial suggests that sucralose could be one of the most efficient LCSs for weight control. Another study reported that the consumption of diet beverages containing sucralose and acesulfame-K reduced weight gain in children compared with those who consumed sugar-sweetened beverages (10). In an overweight population, the replacement of sugar-sweetened beverages by diet beverages tended to induce greater weight loss than water (82). However, these results have been obtained using a limited number of participants. Indeed, larger longitudinal studies are required to draw firm conclusions. In animal models focusing on the effects of sucralose, some studies provided evidence that its consumption was associated with weight gain when compared with water (83–86) or both water and sucrose consumption (87), whereas in other studies no change was reported (88, 89). Nevertheless, even when body weight is not altered, visceral fat can be accumulated, increasing the risk of metabolic syndrome (90). In fact, after a median follow-up of 10 y, Chia et al. (91) reported that LCS consumers had a higher risk of developing abdominal obesity than nonconsumers. To better understand the underlying mechanisms that promote an increase in adipose tissue, a recent study conducted in normal-weight rats drinking sucralose for 10 wk showed no increase in body weight, but did exhibit changes in the distribution of fat pads when compared with their control counterparts (89). The rearrangement of fat compartments leads to metabolic adaptations in this tissue, affecting its metabolic status. Dysregulations in this system can be associated with increased cardiometabolic risk. It has been shown that exposing adipose tissue derived from human mesenchymal stromal cells to LCSs can lead to an increase in adipogenesis. In the same study, the authors demonstrated that this phenomenon was also observed in human adipocytes in individuals with obesity who are known to consume LCSs (92). In rodents, Sánchez-Tapia et al. (84) demonstrated that rats fed with sucrose or sucralose have a significantly larger area of adipocytes compared with those drinking water. Furthermore, the authors describe that the rats fed with sucralose presented with the biggest brown adipocyte size, compared with those fed with water or sucrose. Consistent with the adipogenesis described in human adipocytes, this rodent study demonstrated that sucralose consumption promotes hyperinsulinemia and significantly increases lipogenesis mediated by sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1). Interestingly, it has been reported that sucralose is metabolized by rats into compounds that are less polar and more lipophilic than the

parent compound. Those compounds remained in adipose tissue 2 wk after the last treatment, even when they were not detected in urine and feces (84, 86). Whether the sequestration of sucralose or its secondary metabolites in adipose tissue influences its metabolism remains to be demonstrated. Given that modifications in body composition are known to be associated with cardiovascular impairment, exploration of this phenomenon is of interest to determine if sucralose is associated with cardiovascular dysregulation.

Glucose Metabolism

Fasting glycemia, insulinemia, and glucose regulation

Findings detailing the effect of sucralose consumption on glucose regulation have been contradictory. Variations in the results depend not only on differences in the matrix containing sucralose, but also whether sucralose is ingested alone or if its consumption is followed by a caloric/glucose load to promote changes in glucose and insulin concentrations (22, 27, 93). In their systematic review of studies published from 1996 to 2012, Romo-Romo et al. (94) reported that sucralose consumption was not associated with changes in fasting glucose, insulin, or glycated hemoglobin (HbA1c) in humans; it should be noted, however, that most of the studies they reviewed had evaluated only acute effects of a single exposure to sucralose. The doses of sucralose used in these acute exposure studies were from 60 mg to 1000 mg and were administered via capsules or by using pure sucralose, commercial granular sucralose, or diet soda containing sucralose. These interventions were given alone or before a standard breakfast or an oral-glucose-tolerance test (OGTT) or via intragastric and intraduodenal infusions (74–76, 95–98). With regard to the effects of habitual sucralose consumption, 2 human studies from the same research group reported that 12 and 13 wk of sucralose consumption had no effect on HbA1c, fasting glucose, insulin, and C-peptide. It should be noted, however, that sucralose was administered daily using capsules containing 333 and 667 mg, respectively, in those studies (99, 100).

Four studies have shown a significant reduction in insulin sensitivity after sucralose exposure. Pepino et al. (101) found in 17 participants with morbid obesity that, compared with water consumption, a single exposure to 48 mg sucralose produced higher glucose, insulin, and C-peptide concentrations at specific time-points and a $23 \pm 20\%$ ($P = 0.01$) decrease in insulin sensitivity during a 5-h OGTT. Nichol et al. (102) also showed that an acute exposure to 48 mg of sucralose induced a $30 \pm 10\%$ higher glucose AUC ($P = 0.03$) after an OGTT compared with water in both normal-weight participants and in those with obesity. Moreover, insulin secretion was decreased 20–40 min after the beginning of the OGTT in normal-weight people, whereas it was increased at 90–120 min in individuals with obesity ($P < 0.05$). Interestingly, this latter work showed that, in both normal-weight and obese participants, only sucralose ingestion but not sucralose tasting and expectoration increased glucose AUC during OGTT. Yet, oral sensation on its own could also have

metabolic consequences because sucralose tasting alone, before a glucose drink, significantly dampened the plasma insulin rise. Regarding the chronic effects, when healthy participants consumed daily capsules containing 200 mg of sucralose over a 4-wk period (103), there was a significant ($P < 0.01$) reduction in insulin sensitivity measured with the Matsuda index and the homeostasis model assessment of insulin sensitivity (HOMA-%S) and an increase in both the homeostasis model assessment of β -cell function (HOMA-%B) and the insulinogenic index during an OGTT. A decrease in insulin sensitivity was also demonstrated after an intravenous glucose tolerance test when healthy lean individuals were asked to consume sucralose (15% of the recommended ADI) over a period of 14 d (104). Finally, Dalenberg et al. (105) provided evidence that consumption of beverages containing 60 mg of sucralose and 31.83 g of maltodextrins over a period of 2 wk significantly increased the AUC of insulin ($P < 0.01$), but not with beverages containing only sucralose or only maltodextrins. This study was performed in adults and adolescents. However, the trial was suspended for the adolescents due to an important change in the HOMA-IR in the sucralose/maltodextrin group (from <3.5 to >12.9).

Different mechanisms explaining how sucralose could have an impact on glucose and insulin concentrations have been described, such as an increase in the activation of glucose transporters, the stimulation of incretin release via interaction with sweet taste receptors located in the intestine and in the pancreas, as well as modifications in the gut microbiota (106). Interestingly, sweet taste receptors are also found in pancreatic β cells (107). In vitro studies have shown that LCSs such as sucralose, acesulfame-K, and saccharin activate the TAS1R2/TAS1R3, thus stimulating insulin secretion (40). Although the interaction between LCS and pancreatic β cells does not generate ATP to depolarize the cell membrane and promote insulin secretion, activation of the sweet taste receptors induces this effect via cytoplasmic calcium and cAMP-dependent mechanisms. In studies with isolated pancreatic islets from mice, it has been observed that sucralose can potentiate the release of insulin in the presence of glucose (107). However, many studies have reported little or no absorption of sucralose in humans (50, 108). So, there is a low probability that sucralose interacts with the pancreatic β cells and its metabolic effects are most likely produced exclusively in the gastrointestinal tract (51).

Margolskee et al. (71) provided evidence in animal models that a low-carbohydrate diet supplemented with sucralose, as well as other LCSs (e.g., acesulfame-K and saccharin, but not aspartame), generated a greater expression of SGLT1 in enteroendocrine cells. This increased expression appears to be the consequence of the LCS interaction with the sweet taste receptors, TAS1R3 and α -gustducin, because this effect was not replicated in TAS1R3 and α -gustducin knockout mice. Mace et al. (39) found that LCS stimulated the apical expression of glucose transporter 2, regulated by the sweet taste receptors TAS1R2, TAS1R3, and α -gustducin, in the small intestines of rats. The greatest increase in glucose

absorption caused by LCS was observed with acesulfame-K, followed by sucralose and, to a lesser extent, saccharin. These studies suggest that LCSs can promote both active and passive transport of glucose in the enterocyte.

A recent study performed in male Wistar rats reported that sucralose consumption over a period of 4 mo improved glycemic and insulinemic responses compared with sucrose-consuming rats. These effects were accompanied by reduced insulin receptor substrate 1 and protein kinase B phosphorylation and decreased expression of glucose transporter 4 and SREBP-1 in the basal situation (84).

For many years, including present times, sucralose has been considered not to alter glucose metabolism (26, 109). However, considering recent findings, there is controversy regarding the methodologies that have been used in these studies, which are not sensitive enough (i.e., fasting glucose and insulin, HbA1c, or OGTT) to guarantee that LCSs have a neutral effect on glucose homeostasis. In addition, many of these studies have been crossover trials with a single exposure to sucralose (28). There is a need to perform parallel-randomized clinical trials using more precise techniques such as the hyperinsulinemic euglycemic glucose clamp to identify early changes in variables like insulin sensitivity, which could predispose an individual to developing significant disturbances in glucose tolerance with a longer exposure to sucralose.

Incretin secretion: GLP-1 and GIP

Incretins are intestinal peptides that act as hormones, accounting for $\sim 50\%$ of the postprandial insulin release in a glucose-dependent manner. The main incretins are GLP-1 and GIP. There is evidence that incretins have roles in neogenesis and prevention of β -cell apoptosis in the pancreas (110–112). The administration of GLP-1 in humans reduces food consumption by increasing the feeling of fullness, promoting weight loss in the long term. The mechanisms driving this effect include delayed gastric emptying and the regulation of food intake by the central nervous system (113–115).

Several in vitro and animal studies have indicated that sucralose specifically stimulates the secretion of GLP-1 and GIP. This increase in incretins is induced by the interaction between the sweet taste receptors TAS1R2, TAS1R3, and α -gustducin, located in enteroendocrine L and K cells (71, 72, 84, 116). Nonetheless, it could also be mediated by sucralose-stimulated increase in the expression of the SGLT1 transporter, as previously mentioned (71, 117). Some studies performed in small intestinal tissue of mice suggested that the effect of sucralose on incretins is dose-dependent (116), but other studies reported that higher amounts of sucralose do not potentiate the secretion of incretins (27, 72).

Several studies in humans have evaluated the effects of sucralose on the release of incretins, with contradictory results. In all studies that reported no effect on GLP-1 and GIP secretion, sucralose was consumed alone. The doses used in these trials ranged from 40 to 960 mg. All of them were crossover studies and they evaluated the effects of

sucralose following a single dose of the sweetener (74–76, 97, 118). However, studies that performed an OGTT after sucralose consumption found higher GLP-1 concentrations, suggesting that the combination of this LCS with glucose potentiates the secretion of incretins, when compared with sucralose alone. The doses used in these trials ranged from 24 to 200 mg and each study was also a crossover design (73, 98, 103). It is important to note, however, that 2 studies performed an OGTT after sucralose consumption and found no change in GLP-1 and GIP concentrations (26, 101).

When sucralose was consumed habitually (200 mg/d for 4 wk), higher concentrations of GLP-1 were detected (103). However, it was recently reported that regular sucralose consumption in healthy people for a period of 2 wk did not modify the fasting plasma concentrations of appetite-regulating hormones like GLP-1, ghrelin, leptin, and PYY (119). Two of the studies that reported an effect of sucralose on GLP-1 secretion included participants with type 1 or type 2 diabetes mellitus. Higher concentrations of GLP-1 were detected only in participants with type 1 diabetes and in healthy participants, but not in those with type 2 diabetes (73, 98). Consequently, the increase in GLP-1 secretion could be beneficial for health in patients with type 2 diabetes due to its effect on appetite and insulin release. There have been no reports of an effect of sucralose on GIP in humans.

Leptin and ghrelin secretion

It is also suspected that sucralose alters leptin and ghrelin hormones, which have been recognized to have a major influence on energy balance. Leptin is a hormone produced mainly by the white adipose tissue and is stimulated by insulin. It is involved in appetite regulation and energy expenditure, stimulating the expression of anorexigenic neurons in the hypothalamus in response to increased fat mass (120–122). Individuals with obesity are characterized by hyperleptinemia (123). However, it has also been proposed that leptin signaling through its receptor could be impaired in obesity (124), especially when it is associated with metabolic syndrome (125).

Ghrelin is an orexigenic peptide produced in the stomach, mainly in the gastric fundus. It increases food consumption and promotes weight gain by decreasing fatty acid oxidation (120, 126). The concentrations of these 2 hormones rise during fasting or in a state of negative energy balance and fall with increases in food consumption or obesity, correlating negatively with BMI (122, 127).

An animal study and a clinical trial reported that sucralose consumption over a period of 12 and 2 wk, respectively, did not change leptin concentrations (26, 87). An in vitro study reported that ghrelin concentration is decreased in the presence of sugar, but increased when consumed with sucralose, without being mediated by sweet taste receptors or glucose transporters (128). Two clinical trials have reported that a single exposure of sucralose has no effect on ghrelin concentrations using doses of 62 and 420 mg (74, 96). A study in male C57BL/6 wild-type mice found no changes in ghrelin concentrations after 8 wk of exposure to sucralose (88).

Nevertheless, 3 studies in mice have found a significant increase in body weight after sucralose consumption compared with the control group, although the food intake was decreased in the animals that consumed this LCS (83, 84, 87). One of these studies reported an increase in the adipocyte size and in leptin expression, in addition to a decrease in the expression of adiponectin and the uncoupling protein 1, after 4 mo of exposure to sucralose; the same effects were observed with the high-caloric sweeteners sucrose, glucose, and fructose (84).

Gut microbiota

The gut microbiota is a collection of microorganisms that codevelop with the host from birth according to the host's intrinsic (genetics, health status, etc.) and environmental factors. It is clear that diet itself has an important influence on the composition of gut microbiota (129). The growing appreciation of the relation between gut microbiota and human health over recent years has also raised questions about the impact of habitual LCS consumption on gut microbiota. A primary in vitro observation is that several LCSs, including sucralose, exert strong bacteriostatic effects on the metabolism of many bacterial species found in the gastrointestinal tract (130–132). From an in vivo perspective, a second important consideration is the probability of the LCS interacting with gut microbiota. In this context, it is known that acesulfame-K and saccharin are quickly and readily absorbed into the systemic circulation, which greatly limits their interaction with the colonic microbiome. Sucralose, however, being poorly absorbed, moves through the gastrointestinal tract unchanged, making it a potentially a more potent perturbing agent (50, 51, 86). However, this has not been confirmed. It should also be noted that so far no study has compared the relative in vivo impact of each sweetener on the microbiota.

To date, we have identified 5 preclinical studies assessing gut microbiota changes in response to the habitual consumption of pure sucralose or in the form of commercial sachets (Splenda) (30, 85, 133–135). All of these studies have been conducted on mice or rats, with exposure ranging from 1.1 to 15 mg/kg/d over 6 wk to 6 mo. Together, these studies provide convincing in vivo evidence that habitual sucralose consumption alters the gut microbiota composition (i.e., dysbiosis). In healthy models, the shortest exposures were associated with slight changes, whereas the study with the longest exposure was associated with more bacterial genera being impacted; suggesting that significant, observable microbiome remodeling in response to sucralose exposure can take time to occur. Changes in microbiome are mostly observed at the genus level with the relative presence of some species being up- or downregulated instead of a whole phylum being altered. In this context, all studies also concurrently reported dysbiosis after several weeks of sucralose exposure. However, data are inconsistent when it comes to the genera being impacted by sucralose consumption. Indeed, some studies even reported opposite variations for the same genus (i.e., *Bifidobacterium*) (85, 135). Yet, it

is also unclear whether changes in microbiota induced by sucralose have any direct consequences on the host's health. Because many previous studies have indicated that dysbiosis is associated with propensity to metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes (136–138), there is hope for information indicating whether the sucralose impact on the microbiome would be expected to translate into a metabolic disorder or not. Most of the studies cited reported little to no blunting of the body mass gain in healthy or in diet-induced obese rodents. One study, however, reported an increase in body weight after the supplementation was delivered. Interestingly, in 2 studies, several microbiota metabolites were significantly different between the control mice and those receiving sucralose. Beyond its effect on the composition of the microbiome, there are data indicating that sucralose alters bacterial metabolism *in vivo*, with possible consequences for cholesterol metabolism and an increase in inflammation (133, 134). In contrast, only 1 study assessed the effects of sucralose consumption on the gut microbiota in humans. This randomized controlled trial included 34 participants receiving either sucralose capsules (780 mg/d) or a placebo over a period of 7 d. The gut microbiome was evaluated before and after the intervention, but there was no significant change following sucralose exposure. Nevertheless, changes were only evaluated at the phylum level (109). As a whole, there is accumulating preclinical evidence that long-term consumption of sucralose, even at levels within the ADI, can affect the gut microbiome. It is, however, important to note that data obtained in rodent models could lack clinical relevance because bacterial genera and species differ greatly between mice and humans. There is currently insufficient clinical evidence to exclude any impact of sucralose on the human microbiota. Future studies will have to clarify the effect of sucralose on the balance and diversity of the gut microbiota, as well as the potential functional consequences on bile acids and, thus, cholesterol metabolism, glucose metabolism, and overall health. Demonstration of causality between constituents of the microbiota and specific diseases remains to be determined.

Blood pressure, heart function, and circulation

Several recent epidemiological studies conducted within large US and European cohorts reported an association between habitual and high consumption of LCSs and a higher risk of hypertension, vascular heart diseases, and death from circulatory diseases (13–15). Despite these concerning findings, few studies have provided mechanistic or causal evidence for a direct participatory role of acute and, more importantly, long-term LCS consumption in the impairment of cardiovascular function. Yet, only a few trials with a very limited number of participants have been conducted. We identified only 3 studies aimed at testing the potential hemodynamic consequences of sucralose consumption in humans. One was a tolerance study in which sucralose was administered at doses ≤ 10 mg/kg/d. After 17 d, there was no change in blood pressure (139). A second study was designed to investigate the acute impact of sucralose in

postprandial hypotension, a condition frequently associated with increased mortality in elders. The authors demonstrated that whereas glucose intraduodenal infusion induces a massive increase in superior mesenteric artery blood flow and a decrease in blood pressure, sucralose and saline infusion (4 mM) had no significant effect. Their results, therefore, suggest that it might be beneficial for elders with postprandial hypotension to replace glucose with sucralose (140). However, it is not known whether this effect is specific to sucralose or whether it could be extrapolated to other LCSs. A third study provided similar findings, reporting that flow-mediated dilatation of the brachial artery was not affected after acute consumption of sucralose (141). However, in this latter study, the dose of sucralose that was administered was not mentioned. Considered together, the evidence from these studies is insufficient to rule out the potential association between the habitual consumption of sucralose and an increase in cardiovascular risk. As mentioned before, more long-term and large-scale randomized controlled trials in humans are required. This need for a greater understanding of the interaction between sucralose consumption and cardiovascular health is also emphasized by some preclinical studies. For example, we reported marked vascular endothelial dysfunction in healthy rats after consumption of water sweetened with acesulfame-K and sucralose over a period of 10 wk at doses in line with the ADI (15 mg/kg/d) (89). Although this latter observation is based on the use of a cocktail, preventing any conclusion about the specific effect of sucralose, it is still substantial because of the pivotal role of endothelial dysfunction in atherosclerosis and its adverse complications. Similar concerns have also been recently raised by Chichger's group (142, 143), providing convincing *in vitro* evidence that sucralose can modulate various endothelial cell properties such as vascular permeability, proliferation, migration, adhesion, and tube formation via activation of TAS1R3. There is also a growing body of evidence that TAS2Rs, which can be stimulated by sucralose, are expressed and have a specific function in the cardiovascular system. Notably, Foster and Xin (44, 45, 144) have shown that activation of TAS2Rs results in negative inotropic and vasodilator effects. There is, thus, another possibility that by interacting with TAS2Rs, sucralose can alter the cardiovascular system and play a role in the development of cardiometabolic diseases. Yet the significance of the interaction between sucralose and the taste receptors remains to be determined *in vivo* and at the clinical level. Overall, there is a need to conduct additional well-designed, interventional studies to allow us to better understand epidemiological findings and clarify the long-term impact of consuming LCSs on blood pressure and vascular health, in consumers with or without cardiometabolic risk factors.

Sucralose Consumption During Pregnancy and Lactation

Sucralose persists in the bloodstream for >18 h after ingestion (50); during pregnancy, it can thus reach the

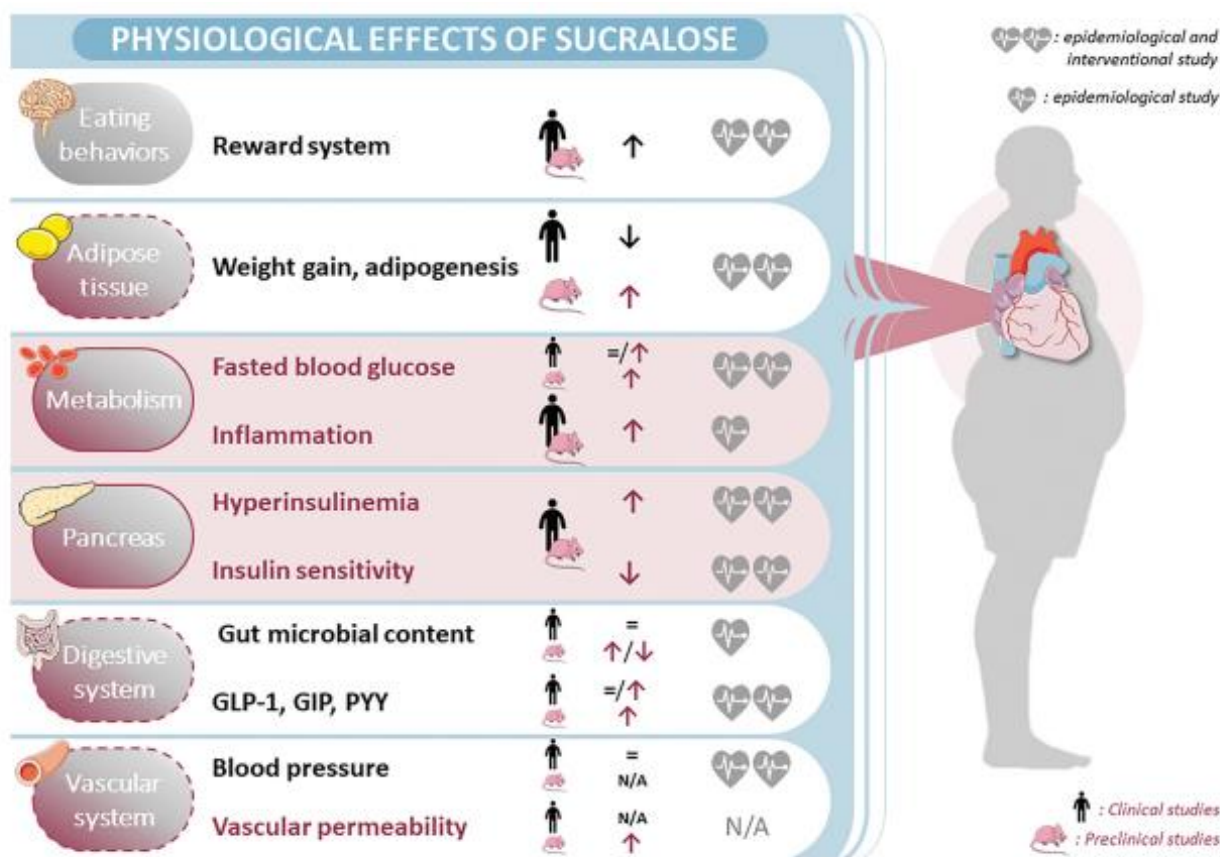


FIGURE 2 The effect of sucralose on digestive, cardiovascular, and metabolic physiology and its potential link with cardiovascular risk. The purple shading represents the effects of sucralose that could potentially explain the increase in total cardiovascular mortality risk. The level of proof is indicated with 1 or 2 hearts for epidemiological only or epidemiological and interventional studies, respectively. GIP, glucose-dependent insulinotropic peptide; GLP-1, glucagon-like peptide-1; N/A, data not available; PYY: peptide tyrosine-tyrosine.

placenta and developing fetus for prolonged periods. Sucralose and other LCSs have also been detected in breast milk (25). Together, these findings raise questions regarding the potential health impacts of maternal sucralose consumption during gestation and breastfeeding on the health of the fetus and infant, respectively. Indeed, exposure to LCSs during gestation or infancy has been suspected to induce long-term effects, with predisposition to metabolic disease being acquired or “programmed” early in life (65). In humans, regular consumption of LCSs by pregnant women has been associated with an elevation in BMI in their children (145). More specifically, the authors described how sucralose consumption by pregnant dams induced subsequent elevations in body weight, adiposity, and insulin resistance in their offspring, especially in males. Notably, in this same study, data from both a culture model of adipocyte differentiation (3T3-L1) and adipose tissue from offspring revealed upregulation of several proadipogenic regulators (e.g., C/EBP- α , FABP4, and FASN) in conditions that had been exposed to sucralose, suggesting that sucralose could directly target adipose tissue. These morphological and metabolic disturbances induced by early-life sucralose exposure could potentially explain microbiota disturbances

in the offspring. Indeed, 2 recent studies described microbiota dysbiosis induced by maternal sucralose consumption, one focusing on the effect of sucralose alone (146) and the other on sucralose mixed with another popular high-intensity sweetener, acesulfame-K (147). The first study demonstrated that maternal sucralose consumption significantly inhibited intestinal development and disrupted barrier function in 3-wk-old offspring. Furthermore, a high-fat diet combined with sucralose consumption exacerbated hepatic steatosis, disturbed fatty acid biosynthesis and metabolism, and induced gut dysbiosis in the progeny. Finally, maternal sucralose consumption promoted low-grade intestinal inflammation and significantly changed the compositions and diversity of the gut microbiota, including a reduction in butyrate-producing bacteria and cecal butyrate production with downregulation of GPR43, an important regulator of inflammatory responses (146). These results were consistent with the second study, which showed a downregulation of hepatic detoxification mechanisms and changes in bacterial metabolites. Indeed, the microbiome profiling confirmed a significant increase in firmicutes and a striking decrease of *Akkermansia muciniphila* (147). The growing body of evidence surrounding the long-term effects of LCS consumption

during pregnancy and throughout the postpartum period on the offspring requires further experimental and clinical studies. The findings from these studies could better inform not only concerned women, but also health organizations, dietary guidelines, and practitioners.

Conclusions

Due to several challenges in separately examining the mechanisms and impact of specific LCSs, most of the scientific literature, especially epidemiological studies, treats LCSs as a large family of molecules. Nevertheless, it is mandatory to remember that each variety of LCS differs markedly in its chemical structure, pharmacokinetic profile, and, more importantly, in its pharmacological activity. Because sucralose is one of the most widely used LCSs in food and drinks worldwide, this review focused on the specific effect of habitual sucralose consumption on cardiometabolic health (Figure 2). Although LCSs, including sucralose, target the same cellular receptors (i.e., TAS1R2/TAS1R3, TAS1R3/TAS1R3, and TAS2Rs), they have different affinities to those receptors, and an individual LCS such as sucralose can also behave as a biased agonist. Thus, sucralose is a specific pharmacological agent inducing its own physiological and pathological responses. Although, as noted earlier, sucralose has been detected in human plasma and breast milk, little is currently known about the distribution of sucralose in nondigestive tissues. This remains a key question to be addressed to better understand the effect of sucralose consumption on human health. Consequently, further research is needed to clarify what concentration of sucralose can be consumed before it has the potential to reach the bloodstream and thus directly act on the cardiovascular system. Noting this, prospective blinded clinical trials and preclinical studies are important to decipher the underlying mechanisms explaining the conflicting results regarding the metabolic and cardiovascular effects of sucralose consumption observed in animal and human studies. Altogether, the available data identified in this present review raise serious concerns, and strongly suggest that more research is needed to assess the potential adverse health impacts of habitual sucralose consumption and its role in increasing lifelong cardiometabolic disease risk.

Acknowledgments

The authors' responsibilities were as follows—GW: developed the scientific question; SR, SB, AR-R: performed the extraction and analysis of the data; SR, SB, AR-R, MR, GW: interpreted results, prepared tables and figures, and drafted and finalized the manuscript; and all authors: read and approved the final manuscript.

References

1. WHO. Obesity and overweight [Internet]. [cited July 6, 2017]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* 2016;387:1513–30.

3. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther* 2008;88:1254–64.
4. Nwaneri C, Cooper H, Bowen-Jones D. Mortality in type 2 diabetes mellitus: magnitude of the evidence from a systematic review and meta-analysis. *Br J Diabetes Vasc Dis* 2013;13:192–207.
5. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs) [Internet]. [cited July 6, 2017]. Available from: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.
6. Johnson RK, Appel LJ, Brands M, Howard BV, Lefevre M, Lustig RH, Sacks F, Steffen LM, Wylie-Rosett J, American Heart Association Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism and the Council on Epidemiology and Prevention. Dietary sugars intake and cardiovascular health. *Circulation* 2009;120:1011–20.
7. Malik V S, Popkin B M, Bray G A, J-P, Hu F B. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation* 2010;121:1356–64.
8. Higgins KA, Mattes RD. A randomized controlled trial contrasting the effects of 4 low-calorie sweeteners and sucrose on body weight in adults with overweight or obesity. *Am J Clin Nutr* 2019;109:1288–301.
9. Vos M B, Kaar J L, Welsh J A, Van Horn L V, Feig D I, Anderson C AM, Patel M J, J C, Krebs N F, Xanthakos S A, et al. Added sugars and cardiovascular disease risk in children: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2017;135:e1017–34.
10. de Ruyter JC, Olthoff MR, Seidell JC, Katan MB. A trial of sugar-free or sugar-sweetened beverages and body weight in children. *N Engl J Med* 2012;367:1397–406.
11. Reid AE, Chauhan BF, Rabbani R, Lys J, Copstein L, Mann A, Abou-Setta AM, Fiander M, MacKay DS, McGavock J, et al. Early exposure to nonnutritive sweeteners and long-term metabolic health: a systematic review. *Pediatrics* 2016;137(3):e20153603.
12. Azad MB, Abou-Setta AM, Chauhan BF, Rabbani R, Lys J, Copstein L, Mann A, Jeyaraman MM, Reid AE, Fiander M, et al. Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *CMAJ* 2017;189:E929–39.
13. Malik VS, Li Y, Pan A, De Koning L, Schernhammer E, Willett WC, Hu FB. Long-term consumption of sugar-sweetened and artificially sweetened beverages and risk of mortality in US adults. *Circulation* 2019;139:2113–25.
14. Mullee A, Romaguera D, Pearson-Stuttard J, Viallon V, Stepien M, Freisling H, Fagherazzi G, Mancini FR, Boutron-Ruault M-C, Kühn T, et al. Association between soft drink consumption and mortality in 10 European countries. *JAMA Intern Med* 2019;179:1479.
15. Mossavar-Rahmani Y, Kamensky V, Manson JE, Silver B, Rapp SR, Haring B, Beresford SAA, Snetselaar L, Wassertheil-Smoller S. Artificially sweetened beverages and stroke, coronary heart disease, and all-cause mortality in the Women's Health Initiative. *Stroke* 2019;50:555–62.
16. Yin J, Zhu Y, Malik V, Li X, Peng X, Zhang FF, Shan Z, Liu L. Intake of sugar-sweetened and low-calorie sweetened beverages and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis and systematic review. *Adv Nutr* [Internet] 2020;nmaa084. doi:10.1093/advances/nmaa084.
17. Belloir C, Neiers F, Briand L. Sweeteners and sweetness enhancers. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2017;20:279–85.
18. Laffitte A, Neiers F, Briand L. Characterization of taste compounds: chemical structures and sensory properties. In: Guichard E, Salles C, Morzel M, Le Bon A-M, editors. *Flavour: from food to perception*. John Wiley & Sons, Ltd; 2016. p. 154–91.
19. Business Wire. Global zero-calorie sweetener market projected to be worth USD 2.84 billion by 2021 [Internet]. Technavio; 2019 [cited October 2, 2020]. Available from: https://web.archive.org/web/20190328081134mp_/https://www.businesswire.com/news/home/20170331005203/en/
20. Anses (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du Travail). Rapport Oqali : Bilan et évolution de l'utilisation des additifs dans les produits transformés [Internet]. [cited October 20, 2020]. Available from: https://www.anses.fr/fr/system/uploads/attach_data/fichier_public/2020/10/20/Oqali_2020.pdf

- <http://www.anses.fr/fr/content/rapport-oqali-bilan-et-%C3%A9volution-de-l'utilisation-des-additifs-dans-les-produits-transform%C3%A9s>
21. Maragkoudakis P. Sugars and sweeteners [Internet]. EU Science Hub; 2017 [cited March 25, 2019]. Available from: <https://ec.europa.eu/jrc/en/health-knowledge-gateway/promotion-prevention/nutrition/sugars-sweeteners>
 22. Tucker RM, Tan S-Y. Do non-nutritive sweeteners influence acute glucose homeostasis in humans? A systematic review. *Physiol Behav* 2017;182:17–26.
 23. Hunter SR, Reister EJ, Cheon E, Mattes RD. Low calorie sweeteners differ in their physiological effects in humans. *Nutrients* 2019;11:2717.
 24. Palatnik A, Moosreiner A, Olivier-Van Stichelen S. Consumption of non-nutritive sweeteners during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2020;223:211–8.
 25. Sylvestre AC, Gardner AL, Bauman V, Blau JE, Garraffo HM, Walter PJ, Rother KL. Non-nutritive sweeteners in breast milk. *J Toxicol Environ Health, Part A* 2015;78:1029–32.
 26. Ahmad SY, Friel JK, MacKay DS. The effect of the artificial sweeteners on glucose metabolism in healthy adults: a randomized double-blinded crossover clinical trial. *Appl Physiol Nutr Metab* 2020;45(6):606–12.
 27. Pepino MY. Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiol Behav* 2015;152:450–5.
 28. Risdon S, Roustit M, Meyer G, Walther G. Is fasting blood glucose a reliable parameter to investigate the effect of non-nutritive sweeteners on glucose metabolism? *Eur J Clin Nutr* 2019;73:331–2.
 29. Magnuson BA, Roberts A, Nestmann ER. Critical review of the current literature on the safety of sucralose. *Food Chem Toxicol* 2017;106:324–55.
 30. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, Israeli D, Zmora N, Gilad S, Weinberger A, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* 2014;514:181–6.
 31. Nelson G, Hoon MA, Chandrasekar J, Zhang Y, Ryba NJP, Zuker CS. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 2001;106:381–90.
 32. Behrens M, Briand L, de March CA, Matsunami H, Yamashita A, Meyerhof W, Weyand S. Structure-function relationships of olfactory and taste receptors. *Chem Senses* 2018;43:81–7.
 33. Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, Zou S, Jiang P, Ninomiya Y, Margolske RF. Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* 2003;301:850–3.
 34. Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E. Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4692–6.
 35. Kojima I, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Hamano K, Medina J, Nagasawa M. Return of the glucoreceptor: glucose activates the glucose-sensing receptor T1R3 and facilitates metabolism in pancreatic β -cells. *J Diabetes Invest* 2015;6:256–63.
 36. Zhang F, Klebansky B, Fine RM, Liu H, Xu H, Servant G, Zoller M, Tachdjian C, Li X. Molecular mechanism of the sweet taste enhancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4752–7.
 37. Servant G, Tachdjian C, Tang X-Q, Werner S, Zhang F, Li X, Kamdar P, Petrovic G, Ditschuneck T, Java A, et al. Positive allosteric modulators of the human sweet taste receptor enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4746–51.
 38. Depoortere I. Taste receptors of the gut: emerging roles in health and disease. *Gut* 2014;63:179–90.
 39. Mace OJ, Affleck J, Patel N, Kellett GL. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2: sweet taste receptors regulate apical GLUT2. *J Physiol* 2007;582:379–92.
 40. Santa-Cruz Calvo S, Egan JM. The endocrinology of taste receptors. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11:213–27.
 41. Torregrossa A-M, Loney GC, Smith JC, Eckel LA. Examination of the perception of sweet- and bitter-like taste qualities in sucralose preferring and avoiding rats. *Physiol Behav* 2015;140:96–103.
 42. Brune NEI, Slack JP, Ungureanu IM, Gray K, Simons CT, Pennimpede JEE. Methods to identify modulators using TAS2R bitter taste receptor [Internet]. US patent US8597896B2. 2013 [cited October 20, 2020]. Available from: <https://patents.google.com/patent/US8597896/en>
 43. Ariyasu T, Matsumoto S, Kyono F, Hanaya T, Arai S, Ikeda M, Kurimoto M. Taste receptor T1R3 is an essential molecule for the cellular recognition of the disaccharide trehalose. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2003;39:80–8.
 44. Foster SR, Porrello ER, Purdue B, Chan H-W, Voigt A, Frenzel S, Hannan RD, Moritz KM, Simmons DG, Molenaar P, et al. Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLoS One* 2013;8:e64579.
 45. Xin W, Chen Q. The cellular mechanism of bitter taste receptor mediated relaxation of rat aorta. *FASEB J* 2017;31:672.5–672.5.
 46. Xin W, Wang T, Jing Y, Fernandes VSL. The novel mechanism of bitter taste receptors attenuating rat ventricular contractility. *FASEB J* 2018;32:839.10–839.10.
 47. Nakagawa Y, Nagasawa M, Mogami H, Lohse M, Ninomiya Y, Kojima I. Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists. *Endocr J* 2013;60:1191–206.
 48. Kojima I, Nakagawa Y, Ohtsu Y, Medina A, Nagasawa M. Sweet taste-sensing receptors expressed in pancreatic β -cells: sweet molecules act as biased agonists. *Endocrinol Metab* 2014;29:12–9.
 49. Roura E, Foster S, Winklebach A, Navarro M, Thomas W, Campbell K, Stowasser M. Taste and hypertension in humans: targeting cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 2016;22:2290–305.
 50. Roberts A, Renwick AG, Sims J, Snodin DJ. Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. *Food Chem Toxicol* 2000;38:31–41.
 51. Magnuson BA, Carakostas MC, Moore NH, Poulos SP, Renwick AG. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutr Rev* 2016;74:670–89.
 52. Meddings JB, Gibbons I. Discrimination of site-specific alterations in gastrointestinal permeability in the rat. *Gastroenterology* 1998;114:83–92.
 53. Su L, Shen L, Clayburgh DR, Nalle SC, Sullivan EA, Meddings JB, Abraham C, Turner JR. Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* 2009;136:551–63.
 54. Teixeira TFS, Collado MC, Ferreira C, Bressan J, Peluzio M do CG. Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutr Res* 2012;32:637–47.
 55. Turner JR, Cohen DE, Mersy RJ, Madara JL. Noninvasive in vivo analysis of human small intestinal paracellular absorption: regulation by Na⁺-glucose cotransport. *Dig Dis Sci* 2000;45:2122–6.
 56. Valle-Pinero AYD, Deventer HEV, Fourie NH, Martino AC, Patel NS, Remaley AT, Henderson WA. Gastrointestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome assessed using a four probe permeability solution. *Clin Chim Acta* 2013;418:97.
 57. Frazier TH, DiBaise JK, McClain CJ. Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *J Parenter Enteral Nutr* 2011;35:145–205.
 58. Jayashree B, Bibin YS, Prabhu D, Shanthirani CS, Gokulakrishnan K, Lakshmi BS, Mohan V, Balasubramanyam M. Increased circulatory levels of lipopolysaccharide (LPS) and zonulin signify novel biomarkers of proinflammation in patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem* 2014;388:203–10.
 59. Peng Y, Gillis-Smith S, Jin H, Tränkner D, Ryba NJP, Zuker CS. Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals. *Nature* 2015;527:512–5.
 60. Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain Behav Immun* 2014;37:134–41.
 61. Yin K-J, Xie D-Y, Zhao L, Fan G, Ren J-N, Zhang L-L, Pan S-Y. Effects of different sweeteners on behavior and neurotransmitters release in mice. *J Food Sci Technol* 2020;57:113–21.
 62. Bachmanov AA, Tordoff MG, Beauchamp GK. Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Chem Senses* 2001;26:905–13.
 63. Schiffman SS, Booth BJ, Losee ML, Pecore SD, Warwick ZS. Bitterness of sweeteners as a function of concentration. *Brain Res Bull* 1995;36:505–13.

64. Wiet SG, Beyts PK. Sensory characteristics of sucralose and other high intensity sweeteners. *J Food Sci* 1992;57:1014–9.
65. de Araujo IE, Oliveira-Maia AJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG, Nicolelis MAL, Simon SA. Food reward in the absence of taste receptor signaling. *Neuron* 2008;57:930–41.
66. Sclafani A, Marambaud P, Ackroff K. Sucrose-conditioned flavor preferences in sweet ageusia T1r3 and Calhm1 knockout mice. *Physiol Behav* 2014;126:25–9.
67. Frank GKW, Oberndorfer TA, Simmons AN, Paulus MP, Fudge JL, Yang TT, Kaye WH. Sucrose activates human taste pathways differently from artificial sweetener. *Neuroimage* 2008;39:1559–69.
68. Tan H-E, Sisti AC, Jin H, Vignovich M, Villavicencio M, Tsang KS, Goffer Y, Zuker CS. The gut-brain axis mediates sugar preference. *Nature* 2020;580:511–6.
69. Sclafani A, Zukerman S, Ackroff K. Postoral glucose sensing, not caloric content, determines sugar reward in C57BL/6J mice. *Chem Senses* 2015;40:245–58.
70. Sclafani A, Glass DS, Margolske RF, Glendinning JL. Gut T1R3 sweet taste receptors do not mediate sucrose-conditioned flavor preferences in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;299:R1643–50.
71. Margolske RF, Dyer J, Kokrashvili Z, Salmon KSH, Ilegems E, Daly K, Maillet EL, Ninomiya Y, Mosinger B, Shirazi-Beechey SP. T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15075–80.
72. Jang H-J, Kokrashvili Z, Theodorakis MJ, Carlson OD, Kim B-J, Zhou J, Kim HH, Xu X, Chan SL, Juhaszova M, et al. Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15069–74.
73. Temizkan S, Deyneli O, Yasar M, Arpa M, Gunes M, Yazici D, Sirikci O, Haklar G, Imeryuz N, Yavuz DG. Sucralose enhances GLP-1 release and lowers blood glucose in the presence of carbohydrate in healthy subjects but not in patients with type 2 diabetes. *Eur J Clin Nutr* 2015;69:162–6.
74. Steinert RE, Frey F, Töpfer A, Drewe J, Beglinger C. Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. *Br J Nutr* 2011;105:1320–8.
75. Wu T, Zhao BR, Bound MJ, Checklin HL, Bellon M, Little TJ, Young RL, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Effects of different sweet preloads on incretin hormone secretion, gastric emptying, and postprandial glycemia in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 2012;95:78–83.
76. Ford HE, Peters V, Martin NM, Sleeth ML, Ghatei MA, Frost GS, Bloom SR. Effects of oral ingestion of sucralose on gut hormone response and appetite in healthy normal-weight subjects. *Eur J Clin Nutr* 2011;65:508–13.
77. Miller PE, Perez V. Low-calorie sweeteners and body weight and composition: a meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Am J Clin Nutr* 2014;100:765–77.
78. Rogers PJ, Hogenkamp PS, de Graaf C, Higgs S, Lluch A, Ness AR, Penfold C, Perry R, Putz P, Yeomans MR, et al. Does low-energy sweetener consumption affect energy intake and body weight? A systematic review, including meta-analyses, of the evidence from human and animal studies. *Int J Obes* 2016;40:381–94.
79. Laviada-Molina H, Molina-Segui F, Pérez-Gaxiola G, Cuellar-García C, Arjona-Villicaña R, Espinosa-Marrón A, Martínez-Portilla RJ. Effects of nonnutritive sweeteners on body weight and BMI in diverse clinical contexts: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2020;21(7):e13020.
80. Toews I, Lohner S, Gaudry DK, Sommer H, Meerpohl JJ. Association between intake of non-sugar sweeteners and health outcomes: systematic review and meta-analyses of randomised and non-randomised controlled trials and observational studies. *BMJ* 2019;364:k4718.
81. Malik VS. Non-sugar sweeteners and health. *BMJ* 2019;364:k5005.
82. Tate DF, Turner-McGrievy G, Lyons E, Stevens J, Erickson K, Polzien K, Diamond M, Wang X, Popkin B. Replacing caloric beverages with water or diet beverages for weight loss in adults: main results of the Choose Healthy Options Consciously Everyday (CHOICE) randomized clinical trial. *Am J Clin Nutr* 2012;95:555–63.
83. Barrios-Correa AA, Estrada JA, Martel C, Olivier M, López-Santiago R, Contreras I. Chronic intake of commercial sweeteners induces changes in feeding behavior and signaling pathways related to the control of appetite in BALB/c mice. *Biomed Res Int* 2018;2018:3628121.
84. Sánchez-Tapia M, Martínez-Medina J, Tovar AR, Torres N. Natural and artificial sweeteners and high fat diet modify differential taste receptors, insulin, and TLR4-mediated inflammatory pathways in adipose tissues of rats. *Nutrients* 2019;11:880.
85. Abou-Donia MB, El-Masry EM, Abdel-Rahman AA, McLendon RE, Schiffman SS. Splenda alters gut microflora and increases intestinal P-glycoprotein and cytochrome P-450 in male rats. *J Toxicol Environ Health A* 2008;71:1415–29.
86. Bornemann V, Werness SC, Buslinger L, Schiffman SS. Intestinal metabolism and bioaccumulation of sucralose in adipose tissue in the rat. *J Toxicol Environ Health A* 2018;81:913–23.
87. Rosales-Gómez CA, Martínez-Carrillo BE, Reséndiz-Albor AA, Ramírez-Durán N, Valdés-Ramos R, Mondragón-Velásquez T, Escoto-Herrera JA. Chronic consumption of sweeteners and its effect on glycaemia, cytokines, hormones, and lymphocytes of GALT in CD1 mice. *Biomed Res Int* 2018;2018:1345282.
88. Steensels S, Cools L, Avau B, Vancleef L, Farré R, Verbeke K, Depoortere I. Supplementation of oligofructose, but not sucralose, decreases high-fat diet induced body weight gain in mice independent of gustducin-mediated gut hormone release. *Mol Nutr Food Res* 2017;61:1600716.
89. Risdon S, Meyer G, Marziou A, Riva C, Roustit M, Walther G. Artificial sweeteners impair endothelial vascular reactivity: preliminary results in rodents. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2020;30:843–6.
90. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697–738.
91. Chia CW, Shadell M, Tanaka T, Liu DD, Gravenstein KS, Simonsick EM, Egan JM, Ferrucci L. Chronic low-calorie sweetener use and risk of abdominal obesity among older adults: a cohort study. *PLoS One* 2016;11:e0167241.
92. Kundu N, Domingues CC, Patel J, Aljishi M, Ahmadi N, Fakhri M, Sylvestre AC, Sen S. Sucralose promotes accumulation of reactive oxygen species (ROS) and adipogenesis in mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2020;11:250.
93. Chan CB, Hashemi Z, Subhan FB. The impact of low and no-caloric sweeteners on glucose absorption, incretin secretion, and glucose tolerance. *Appl Physiol Nutr Metab* 2017;42:793–801.
94. Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, Brito-Córdova GX, Gómez Díaz RA, Vilchis Valentin D, Almeda-Valdes P. Effects of the non-nutritive sweeteners on glucose metabolism and appetite regulating hormones: systematic review of observational prospective studies and clinical trials. *PLoS One* 2016;11:e0161264.
95. Mezitis NH, Maggio CA, Koch P, Quddoos A, Allison DB, Pi-Sunyer FX. Glycemic effect of a single high oral dose of the novel sweetener sucralose in patients with diabetes. *Diabetes Care* 1996;19:1004–5.
96. Brown AW, Bohan Brown MM, Onken KL, Beitz DC. Short-term consumption of sucralose, a nonnutritive sweetener, is similar to water with regard to select markers of hunger signaling and short-term glucose homeostasis in women. *Nutr Res* 2011;31:882–8.
97. Ma J, Bellon M, Wishart JM, Young R, Blackshaw LA, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Effect of the artificial sweetener, sucralose, on gastric emptying and incretin hormone release in healthy subjects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009;296:G735–9.
98. Brown RJ, Walter M, Rother KI. Effects of diet soda on gut hormones in youths with diabetes. *Diabetes Care* 2012;35:959–64.
99. Grotz VL, Henry RR, McGill JB, Prince MJ, Shamon H, Trout JR, Pi-Sunyer FX. Lack of effect of sucralose on glucose homeostasis in subjects with type 2 diabetes. *J Am Diet Assoc* 2003;103:1607–12.
100. Grotz VL, Pi-Sunyer X, Porte D, Roberts A, Trout JR. A 12-week randomized clinical trial investigating the potential for sucralose to affect glucose homeostasis. *Regul Toxicol Pharmacol* 2017;88:22–33.

101. Pepino MY, Tiemann CD, Patterson BW, Wice BM, Klein S. Sucralose affects glycemic and hormonal responses to an oral glucose load. *Diabetes Care* 2013;36:2530–5.
102. Nichol AD, Salame C, Rother KI, Pepino MY. Effects of sucralose ingestion versus sucralose taste on metabolic responses to an oral glucose tolerance test in participants with normal weight and obesity: a randomized crossover trial. *Nutrients* 2019;12:29.
103. Lertrit A, Srimachai S, Saetung S, Chanprasertyothin S, Chailurkit L-O, Areevut C, Katekao P, Ongphiphadhanakul B, Sriphrapradang C. Effects of sucralose on insulin and glucagon-like peptide-1 secretion in healthy subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrition* 2018;55–56:125–30.
104. Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, Brito-Córdova GX, Gómez-Díaz RA, Almeda-Valdes P. Sucralose decreases insulin sensitivity in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2018;108:485–91.
105. Dalenborg JR, Patel BP, Denis R, Veldhuizen MG, Nakamura Y, Vinke PC, Luquet S, Small DM. Short-term consumption of sucralose with, but not without, carbohydrate impairs neural and metabolic sensitivity to sugar in humans. *Cell Metab* 2020;31:493–502.e7.
106. Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, Gómez-Díaz RA, Brito-Córdova GX, Gómez-Velasco DV, López-Rocha MJ, Almeda-Valdés P. Non-nutritive sweeteners: evidence on their association with metabolic diseases and potential effects on glucose metabolism and appetite. *Rev Invest Clin* 2017;69:129–38.
107. Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev VO, Lohse MJ, Shigemura N, Ninomiya Y, Kojima I. Sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One* 2009;4:e5106.
108. Rother KI, Sylvestsky AC, Walter PJ, Garraffo HM, Fields DA. Pharmacokinetics of sucralose and acesulfame-potassium in breast milk following ingestion of diet soda. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018;66:466–70.
109. Thomson P, Santibañez R, Aguirre C, Galgani JE, Garrido D. Short-term impact of sucralose consumption on the metabolic response and gut microbiome of healthy adults. *Br J Nutr* 2019;122:856–62.
110. Gromada J, Holst JJ, Rorsman P. Cellular regulation of islet hormone secretion by the incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 1998;78:583–94.
111. Campioni M, Toffolo G, Shuster LT, Service FJ, Rizza RA, Cobelli C. Incretin effect potentiates β -cell responsiveness to glucose as well as to its rate of change: OGTT and matched intravenous study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E54–60.
112. Garber AJ. Incretin effects on β -cell function, replication, and mass. *Diabetes Care* 2011;34:S258–63.
113. Gutzwiller J, Goke B, Drewe J, Hildebrand P, Ketterer S, Handschin D, Winterhalder R, Conen D, Beglinger C. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. *Gut* 1999;44:81–6.
114. Asmar M. New physiological effects of the incretin hormones GLP-1 and GIP. *Dan Med Bull* 2011;58:B4248.
115. Shah M, Vella A. Effects of GLP-1 on appetite and weight. *Rev Endocr Metab Disord* 2014;15:181–7.
116. Daly K, Al-Rammahi M, Arora DK, Moran AW, Proudman CJ, Ninomiya Y, Shirazi-Beechey SP. Expression of sweet receptor components in equine small intestine: relevance to intestinal glucose transport. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;303:R199–208.
117. Gorboulev V, Schürmann A, Vallon V, Kipp H, Jaschke A, Klessen D, Friedrich A, Scherneck S, Rieg T, Cunard R, et al. Na⁺-d-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes* 2012;61:187–96.
118. Ma J, Chang J, Checklin HL, Young RL, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Effect of the artificial sweetener, sucralose, on small intestinal glucose absorption in healthy human subjects. *Br J Nutr* 2010;104:803–6.
119. Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, López-Carrasco MG, Guillén-Pineda LE, Brito-Córdova GX, Gómez-Díaz RA, Gómez-Pérez JF, Almeda-Valdes P. Sucralose consumption over 2 weeks in healthy subjects does not modify fasting plasma concentrations of appetite-regulating hormones: a randomized clinical trial. *J Acad Nutr Diet* 2020;120:1295–304.
120. Williams J, Mobarhan S. A critical interaction: leptin and ghrelin. *Nutr Rev* 2003;61:391–3.
121. Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008;18:158–68.
122. Suzuki K, Simpson KA, Minnion JS, Shillito JC, Bloom SR. The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. *Endocr J* 2010;57:359–72.
123. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995;1:1155–61.
124. Morris A. Mechanisms of leptin resistance revealed. *Nat Rev Endocrinol* 2018;14:628.
125. Paz-Filho GJ, Volaco A, Suplicy HL, Radominski RB, Boguszewski CL. Decrease in leptin production by the adipose tissue in obesity associated with severe metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009;53:1088–95.
126. Côté CD, Zadeh-Tahmasebi M, Rasmussen BA, Duca FA, Lam TKT. Hormonal signaling in the gut. *J Biol Chem* 2014;289:11642–9.
127. Ikezaki A, Hosoda H, Ito K, Iwama S, Miura N, Matsuoka H, Kondo C, Kojima M, Kangawa K, Sugihara S. Fasting plasma ghrelin levels are negatively correlated with insulin resistance and PAI-1, but not with leptin, in obese children and adolescents. *Diabetes* 2002;51:3408–11.
128. Steensels S, Vancleef L, Depoortere I. The sweetener-sensing mechanisms of the ghrelin cell. *Nutrients* 2016;8:795.
129. Graf D, Di Cagno R, Fåk F, Flint HJ, Nyman M, Saarela M, Watzl B. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:26164.
130. Omran A, Ahearn G, Bowers D, Swenson J, Coughlin C. Metabolic effects of sucralose on environmental bacteria. *J Toxicol* 2013;2013:372986.
131. Pfeffer M, Ziesenitz SC, Siebert G. Acesulfame K, cyclamate and saccharin inhibit the anaerobic fermentation of glucose by intestinal bacteria. *Z Ernahrungswiss* 1985;24:231–5.
132. Prashant GM, Patil RB, Nagaraj T, Patel VB. The antimicrobial activity of the three commercially available intense sweeteners against common periodontal pathogens: an in vitro study. *J Contemp Dent Pract* 2012;13:749–52.
133. Uebanso T, Ohnishi A, Kitayama R, Yoshimoto A, Nakahashi M, Shimohata T, Mawatari K, Takahashi A. Effects of low-dose non-caloric sweetener consumption on gut microbiota in mice. *Nutrients* 2017;9:560.
134. Bian X, Chi L, Gao B, Tu P, Ru H, Lu K. Gut microbiome response to sucralose and its potential role in inducing liver inflammation in mice. *Front Physiol* 2017;8:487.
135. Wang Q-P, Browman D, Herzog H, Neely GG. Non-nutritive sweeteners possess a bacteriostatic effect and alter gut microbiota in mice. *PLoS One* 2018;13:e0199080.
136. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, Liang S, Zhang W, Guan Y, Shen D, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012;490:55–60.
137. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:979–84.
138. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, Guiot Y, Derrien M, Muccioli GG, Delzenne NM, et al. Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:9066–71.
139. Baird IM, Shephard NW, Merritt RJ, Hildick-Smith G. Repeated dose study of sucralose tolerance in human subjects. *Food Chem Toxicol* 2000;38(Suppl 2):123.

140. Pham HT, Stevens JE, Rigda RS, Phillips LK, Wu T, Hausken T, Soenen S, Visvanathan R, Rayner CK, Horowitz M, et al. Effects of intraduodenal administration of the artificial sweetener sucralose on blood pressure and superior mesenteric artery blood flow in healthy older subjects. *Am J Clin Nutr* 2018;108:156–62.
141. Memon MQ, Simpson EJ, Macdonald IA. Effect of fructose and sucralose on flow-mediated vasodilatation in healthy, white European males. *J Pak Med Assoc* 2014;64:743–7.
142. Harrington EO, Vang A, Braza J, Shil A, Chichger H. Activation of the sweet taste receptor, T1R3, by the artificial sweetener sucralose regulates the pulmonary endothelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018;314:L165–76.
143. Lizunkova P, Enuwosa E, Chichger H. Activation of the sweet taste receptor T1R3 by sucralose attenuates VEGF-induced vasculogenesis in a cell model of the retinal microvascular endothelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2019;257:71–81.
144. Foster SR, Blank K, See Hoe LE, Behrens M, Meyerhof W, Peart JN, Thomas WG. Bitter taste receptor agonists elicit G-protein-dependent negative inotropy in the murine heart. *FASEB J* 2014;28:4497–508.
145. Azad MB, Archibald A, Tomczyk MM, Head A, Cheung KG, de Souza RJ, Becker AB, Mandhane PJ, Turvey SE, Moraes TJ, et al. Nonnutritive sweetener consumption during pregnancy, adiposity, and adipocyte differentiation in offspring: evidence from humans, mice, and cells. *Int J Obes* 2020;44:2137–48.
146. Dai X, Guo Z, Chen D, Li L, Song X, Liu T, Jin G, Li Y, Liu Y, Ajiguli A, et al. Maternal sucralose intake alters gut microbiota of offspring and exacerbates hepatic steatosis in adulthood. *Gut Microbes* 2020;11:1043–63.
147. Olivier-Van Stichelen S, Rother KI, Hanover JA. Maternal exposure to non-nutritive sweeteners impacts progeny's metabolism and microbiome. *Front Microbiol* 2019;10:1360.

ii. L'acésulfame de potassium

À notre connaissance, peu de travaux se sont intéressés aux effets spécifiques de l'Ace-K sur les différents facteurs de risques CV et métaboliques, notamment parce que cet édulcorant est principalement utilisé en combinaison avec d'autres molécules (Magnuson et al., 2016 ; Higgins et Mattes, 2019). Ce chapitre a néanmoins pour objectif de rapporter les données de la littérature disponibles à ce jour concernant les effets de la consommation d'Ace-K seul sur la composition corporelle, le contrôle glycémique et la fonction vasculaire.

Effet sur la masse corporelle

L'utilisation des édulcorants est considérée comme une nouvelle stratégie associée permettant de limiter l'augmentation de la masse corporelle, ou à minima le maintien de celle-ci dans le temps pour les personnes atteintes de troubles alimentaires. Si la seule méta-analyse, d'études observationnelles robuste sur ce sujet, a observé une association positive entre la consommation d'édulcorants et la masse corporelle (Hunter et al., 2019), les méta-analyses d'essais contrôlés randomisés tendent à ne montrer aucune association, ou éventuellement une association négative, entre la consommation d'édulcorants et l'évolution de la masse corporelle (Azad et al., 2017 ; Miller et Perez, 2014 ; Rogers et al., 2016 ; Laviada-Molina et al., 2020 ; Toews et al., 2019). Cependant, aucune information sur l'effet propre à l'Ace-K n'a été évaluée dans ces études.

Pour cette raison, Hess et coll., ont mené une enquête transversale afin de déterminer s'il existait une association entre la quantité d'édulcorants consommés et les facteurs de risque du syndrome métabolique chez 125 adultes américains. Bien qu'aucune association significative entre le syndrome métabolique et la consommation des édulcorants n'ait été trouvée, l'augmentation du tour de taille a été positivement associé à la consommation d'édulcorants, tous types de molécules confondus, mais aussi à la consommation quotidienne de plus de 3mg d'Ace-K ($R^2=0,40$; $P=0,024$) (Hess et al., 2018). Dans ce sens, il est intéressant de noter que l'Ace-K après 8 jours de traitement semble stimuler, indépendamment de l'activation des récepteurs TAS1R2/3, les mécanismes de d'adipogenèse et d'inhibition de la lipolyse sur des lignées de cellules souches non différenciées humaines et de souris (Simon et al., 2013). Ces éléments pourraient participer à expliquer une accumulation exagérée de tissu adipeux chez les consommateurs de cette molécule (Hess et al., 2018). La question des quantités consommées minimales pour engendrer de tels mécanismes chez l'homme reste cependant totalement ouverte.

Quelques travaux sur des modèles animaux peuvent apporter certains éléments de réponse. En effet, des études chez le rongeur montrent que la consommation d'Ace-K (37,5 mg/kg/jour)

pendant seulement 2 semaines favorise une augmentation jusqu'à 50% de la masse corporelle, par rapport aux rongeurs ayant consommé de l'eau (Bian et al., 2017). Dans cette étude, le développement de cette obésité semble être lié à l'inflammation causée par la consommation de d'Ace-K altérant l'équilibre du microbiote intestinal. Cependant, ce phénomène n'a été observé que sur les animaux femelles. Au contraire, d'autres travaux chez le rat et la souris démontrent que cet édulcorant, consommé à une concentration respectant la DJA ou au-delà de celle-ci sur des périodes allant de 4 à plus de 30 semaines, n'induirait pas d'effet significatif sur la masse corporelle (Cong et al., 2013 ; Dong et al., 2015 ; Uebanso et al., 2017 ; Glendinning et al., 2019 ; Plows et al., 2020). De plus, même si la masse corporelle reste inchangée, il est nécessaire de conduire des travaux complémentaires afin d'évaluer les effets de cette consommation chronique sur les différents compartiments adipeux, tel que le tissu adipeux viscéral. La seule étude disponible à ce jour ne rapporte pas d'hypertrophie de ce tissu chez la souris en gestation ayant consommé durant 8 semaines de l'Ace-K dans l'eau de boisson (12,5 mM) (Plows et al., 2020). Dans le sens de ces résultats, une étude chez la souris a montré que la consommation seule d'Ace-K pendant un mois a permis de stimuler un relargage de neurotransmetteurs entrant dans la boucle de régulation centrale de la sensation de plaisir associée habituellement à une consommation de sucres contenant des calories. Néanmoins, aucune conséquence n'a été rapportée, ni sur la prise alimentaire, ni sur la variation de masse corporelle en comparaison avec les souris du groupe contrôle consommant de l'eau (Yin et al., 2020). Bien que la consommation d'Ace-K ne soit pas associée à une prise calorique, contrairement aux molécules sucrées traditionnelles, la libération des neurotransmetteurs telle que la dopamine est connue pour conditionner des mécanismes post-oraux influençant les réponses métaboliques (Sclafani et al., 2011).

Effet sur le contrôle glycémique

Les études portant sur l'effet de la consommation spécifique d'Ace-K sur la régulation du glucose sont peu nombreuses, quelles que soient les espèces, et parfois contradictoires. Nous allons présenter dans ce paragraphe les données disponibles sur l'effet de l'Ace-k sur l'absorption cellulaire du glucose, la sécrétion des incrétines, la sensibilité à l'insuline et ainsi la tolérance au glucose.

Des travaux sur des lignées cellulaires intestinales humaines et animales, de type Caco-2 et RIE-1 respectivement, ont rapporté que l'incubation de ces cellules avec de l'Ace-K (10mM) pendant 30 minutes conduit à une augmentation de 20 à 30% de l'absorption de glucose, par rapport aux cellules contrôles sans Ace-K et que cet effet semble causé par le recrutement apical à la membrane des transporteurs du glucose GLUT2 (Zheng et Sarr 2013 ; Mace et al., 2007). *In vivo*, sur un modèle de rat anesthésié, l'infusion directe au niveau du tractus gastro-intestinal proximal de l'Ace-K ne semble pas participer à l'augmentation postprandiale de l'absorption du glucose (Chaudhry 2013). Cependant,

suite à une consommation chronique d'Ace-K (10mM) chez la souris sauvage durant 2 semaines, une augmentation des co-transporteurs sodium-glucose SGLT1 au niveau intestinal a été rapportée. Ce phénomène, témoignant d'un probable effet d'augmentation de l'absorption du glucose, était de plus dépendant des récepteurs au goût sucré (Margolskee et al. 2007).

La présence de ces récepteurs qui ne se limite pas uniquement à la langue mais s'étend également au niveau des cellules épithéliales de l'intestin grêle de rongeurs et autres mammifères, mais également chez l'homme, suggère l'étendue d'action potentielle de l'Ace-K sur ces différents tissus (Jang et al. 2007 ; Mace et al. 2007). Tout comme lors de l'activation de ces récepteurs par le glucose au niveau intestinal, l'incubation de cellules entéro-endocrines HuTu-80 avec de l'Ace-K à 50mM a permis d'induire une sécrétion de GLP-1, par un mécanisme dépendant de l'activation de la sous-unité TAS1R3 du récepteur au goût sucré (Ohtsu 2014).

Dans les cellules pancréatiques de souris, les récepteurs TAS1R2 et 3 ont également été identifiés. La présence d'Ace-K (3mM) dans le milieu de culture de ces cellules a permis d'augmenter la sécrétion d'insuline mais a également de potentialiser la réponse de l'insuline à 25mM de glucose (Nakagawa et al., 2009). *In vivo*, la consommation d'une boisson contenant une concentration de 12,5 mM d'Ace-k pendant 40 semaines chez la souris a entraîné une augmentation du niveau d'insuline basal ainsi qu'une réduction de la taille des cellules pancréatiques sans qu'une modification des niveaux de glycémie soit observée (Cong et al., 2013). Ces données sont confirmées par d'autres travaux présentant des périodes d'exposition à l'Ace-K variant de quelques jours à plusieurs semaines (Ibi et al., 2018 ; Fujita et al., 2009 ; Cong et al., 2013).

Par ailleurs, l'ingestion d'une charge en Ace-K chez l'homme dans le cadre d'une étude randomisée impliquant des sujets en bonne santé n'a permis d'observer aucune modification de la réponse glycémique, contrairement à l'ingestion de glucose (Steinert et al., 2011). Néanmoins, la consommation d'édulcorant dans ces études n'était pas combinée à l'absorption d'une charge de glucose, ne permettant pas de démasquer un potentiel effet de l'Ace-K sur le contrôle glycémique, comme cela a été discuté précédemment (Risdon et al., 2018, Pepino, 2013). Cependant, Bryant et coll. démontrent que malgré la présence de glucose dans une solution test à base d'Ace-K, aucun effet significatif de cette ingestion n'a été relevé sur le contrôle glycémique en comparaison avec une situation placebo chez des sujets adultes en bonne santé (Bryant et al., 2014). Seuls les travaux chez la souris en gestation démontrent que 8 semaines d'Ace-K dans l'eau de boisson augmentent l'aire sous la courbe de 24% lors du test de tolérance au glucose (Plows et al., 2020).

Ainsi, ces rares études de la littérature semblent indiquer qu'une consommation d'Ace-K ne

modifie pas la réponse glycémique lorsqu'elle est associée à une charge en glucose dans les études *in vivo*, et ce malgré l'augmentation du taux d'absorption glucidique et de sécrétion d'incrétines rapportée dans les études *in vitro*. De plus, aucune donnée à notre connaissance ne s'intéresse aux effets de l'Ace-K sur la sensibilité à l'insuline ou l'insulino-résistance sur des modèles expérimentaux. Pourtant, cette information semble essentielle au regard des résultats présentés dans les études de culture cellulaire et chez l'animal, montrant une sécrétion d'insuline augmentée en réponse à l'exposition ou l'ingestion d'Ace-K respectivement. De futures études doivent ainsi mieux préciser les mécanismes impliqués dans le contrôle glycémique en réponse à une consommation d'Ace-K, mais aussi explorer ces effets dans des modèles présentant une altération du contrôle glycémique préalable.

Effet sur la fonction cardiovasculaire

Les études épidémiologiques récentes abordées précédemment dans le manuscrit ont fait état d'une association entre une consommation quotidienne de plus de 2 boissons par jour et un risque plus élevé d'hypertension, de maladies cardiaques vasculaires et de décès dus à des maladies circulatoires (Qin et al., 2020 ; Mullee et al., 2019 ; Mossavar-Rahmani et al., 2019). Malgré ces résultats observationnels, peu d'études ont fourni des preuves mécanistiques ou causales d'un rôle participatif direct de la consommation aiguë et, plus important encore, à long terme d'édulcorants dans l'altération de la fonction CV. À notre connaissance, seule une étude s'est spécifiquement intéressée aux effets de la consommation de 6 semaines d'Ace-K (4 mg/kg) chez la souris sur la survenue d'accidents vasculaires cérébraux induits par une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne gauche. Après un traitement à l'Ace-K, la lésion ischémique cérébrale (estimée par le volume de l'ischémie et les résultats neurocomportementaux) a été considérablement aggravée et accompagnée d'une réduction de l'angiogenèse dans le cerveau ischémié. De plus, la fonction des cellules progénitrices endothéliales a été altérée par rapport aux souris contrôles ou nourries avec du saccharose (Dong et al., 2015).

Ces résultats incitent à conduire des travaux complémentaires permettant d'identifier les effets spécifiques de l'Ace-K, consommé à des concentrations respectant la DJA, sur l'homéostasie vasculaire et de comprendre les mécanismes d'action sous-jacents à ces phénomènes.

iii. Le mélange sucralose et acésulfame de potassium

Alors que le cocktail d'édulcorants sucralose et Ace-K est largement retrouvé sur les étiquettes d'emballages alimentaires, notamment pour les boissons de type soda sans sucres, il est surprenant de voir que peu d'études ont cherché à identifier les conséquences métaboliques et CV de la consommation de ce cocktail. Ce paragraphe va ainsi présenter les données actuelles de cette combinaison d'édulcorants sur les modifications de masse corporelle ainsi que sur la tolérance au glucose, cette dernière n'ayant été explorée que par une seule équipe. Enfin, à notre connaissance, aucune information clinique ou pré-clinique n'est disponible sur les effets de cette consommation sur la fonction CV.

Effet sur la composition corporelle

Chez l'homme adulte, la seule étude à notre connaissance montre une réduction de la masse corporelle après 10 semaines de consommation d'une boisson édulcorée, contenant du sucralose et de l'Ace-K, par rapport à la consommation d'une boisson sucrée traditionnelle. Néanmoins, cette étude ne nous permet pas d'évaluer les effets potentiels induit par l'Ace-K en synergie avec le sucralose, puisque la boisson utilisée ici est une boisson commerciale contenant approximativement 22% d'Ace-K et mélangée à trois autres édulcorants intenses (aspartame, cyclamate et saccharine) (Raben et al., 2002). Il existe toutefois une étude randomisée contrôlée chez l'enfant, corroborant l'étude précédente, rapportant une baisse de l'indice de masse corporelle associée à la consommation du mélange Ace-K/sucralose pendant 18 mois, par rapport à la consommation de saccharose (de Ruyter et al., 2012). Néanmoins, il est nécessaire de prendre en considération que les doses d'édulcorants consommées par les enfants et adolescents, sont supérieures proportionnellement par rapport à celles absorbées par les adultes, au regard de la différence de poids (Huvaere et al., 2012). De manière intéressante cependant, la progéniture de ratte consommant une boisson combinant Ace-K et sucralose, à une concentration atteignant deux fois la DJA, présente une masse corporelle inférieure au groupe contrôle consommant de l'eau (Olivier-Van Stichelen et al., 2019). Ce cocktail d'édulcorants a également été identifié dans le lait et le plasma chez des femmes qui allaitaient, et qui consommaient régulièrement ces boissons, suggérant ainsi une exposition à ces molécules même après la naissance (Rother et al., 2018).

Seule une étude chez le cochon s'est intéressée plus en profondeur à la composition corporelle en réponse à une consommation durant 3 mois dans la nourriture de 1 mg/kg/jour et 0,5 mg/kg/jour respectivement de sucralose et d'Ace-K, correspondant à une consommation quotidienne de 500mL de boisson. Si la masse corporelle n'a pas été modifiée dans cette étude, il est à noter que le tissu

adipeux abdominal a été augmenté de 20% pour ces concentrations d'édulcorants (Malbert et al., 2019).

Effet sur le contrôle glycémique

L'étude de Malbert et coll. a également rapporté que ce cocktail, sans affecter la résistance à l'insuline systémique, augmente la sensibilité à l'insuline et l'absorption du glucose dans le tissu adipeux et dans le cerveau. Ces observations sont en partie corroborées chez l'homme, puisqu'aucune modification significative de la sécrétion d'insuline ou de la tolérance au glucose chez le sujet sain ainsi que chez le patient diabétique (de type 1 et 2) n'a été rapportée après la consommation d'une boisson commerciale contenant le mélange sucralose/Ace-K en comparaison avec une boisson contenant uniquement de l'eau (Brown et al., 2009, Brown et al., 2012). Le même groupe a ensuite mené une étude cherchant à évaluer l'insulinémie et la sécrétion d'incrétines en réponse à une consommation de différentes boissons édulcorées. Le protocole consistait à l'ingestion de 355 mL de soda commercial « sans sucres » (18mg sucralose, 18mg d'Ace-K, 57mg d'aspartame), d'eau supplémentée avec le cocktail sucralose/Ace-k (68 et 41mg respectivement) et d'eau, solution présentée dans un ordre aléatoire pour chaque sujets d'une population incluant 31 personnes adultes sans complications métaboliques ou CV sélectionnées de manière randomisée et contrôlée. Après un test de tolérance au glucose, une augmentation du pic d'insuline a été observée, quelles que soient les boissons édulcorées en comparaison avec la consommation d'eau. Cela, sans pour autant altérer la glycémie ou la sécrétion d'incrétines par rapport à la condition contrôle (Sylvetsky et al., 2016).

Il semble ainsi nécessaire de mieux comprendre si la réponse insulinaire après une consommation d'édulcorant préalablement à une prise alimentaire de glucides peut avoir une significativité clinique. Cela pose aussi la question de la répétition de cette réponse de la sécrétion d'insuline chez des consommateurs réguliers et quotidiens de boissons contenant ce cocktail d'édulcorants.

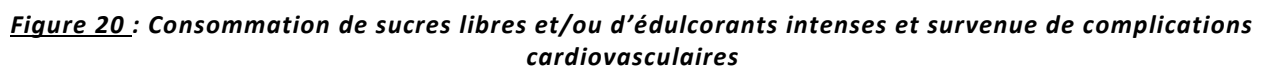
Une étude récente en Australie s'est justement intéressée à cette question. Cette étude a inclus 27 sujets en double aveugle et de manière randomisée, pour lesquels il était proposé soit une gélule contenant un mélange d'Ace-K et de sucralose à raison de 52mg d'Ace-K et 92mg de sucralose respectivement (équivalent à 1,5L de boisson sans sucres (n=14)), soit une gélule contenant un placebo (n=13). Ces gélules étaient consommées trois fois par jour avant les repas pendant 2 semaines. Une endoscopie à jeun réalisée après le traitement, associée à une perfusion intra-duodénale de glucose durant 30 minutes (30g/150mL, 3 kcal/min), a révélé chez les sujets consommant les édulcorants une augmentation de la valeur d'aire sous la courbe (AUC) inverse pour l'absorption du glucose ainsi que

pour la glycémie de 23% et 27% respectivement. Chez ces patients, une baisse de 35% de la valeur d'AUC inverse pour les taux de GLP-1 a été observée en comparaison avec les mesures réalisées avant la perfusion de glucose. Aucun de ces paramètres n'a été modifié avec le placebo. Néanmoins, les réponses de GIP et de l'insuline à la présence de glucose entéral n'ont pas été affectées par l'exposition à l'Ace-K en comparaison avec l'ingestion du placebo. Chez l'homme en bonne santé, 2 semaines de supplémentation avec des édulcorants ont donc augmenté l'absorption du glucose au niveau entéral ainsi que les taux systémiques circulants de celui-ci, tout en atténuant la libération de GLP-1. Ces données chez l'homme indiquent que ce cocktail d'édulcorants peut donc avoir un impact délétère sur le contrôle de la glycémie aiguë, et souligne un risque d'excursions glycémiques postprandiales exagérées chez les consommateurs réguliers d'édulcorants en grande quantité (Young et al., 2017).

L'ensemble de ces données sur la composition corporelle et le contrôle glycémique permet ainsi de questionner les effets de la consommation aiguë et chronique de ce cocktail sucralose/Ace-K sur le système CV, très sensible à l'accumulation de tissu adipeux et aux dérégulations métaboliques (Fig. 20).

Ce qu'il faut retenir :

- La consommation de boissons sucrées a directement été reliée au développement de morbidités telles que l'obésité, le DT2 ou encore à la survenue d'altérations vasculaires, participant à l'élévation de la mortalité totale et cardiovasculaire chez les consommateurs de plus de deux boissons sucrées par jour. De la même façon, la consommation de boissons édulcorées (2 ou plus par jour) est associée à l'élévation du risque de survenue des maladies circulatoires, et participe à la hausse de la mortalité totale et cardiovasculaire. Ce risque de mortalité en lien avec la consommation de boissons sucrées ou édulcorées est exacerbé chez les patients en surpoids ou obèses chez qui les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité.
- Les effets délétères médiés par la consommation de sucres libres sur la santé cardiométabolique découlent d'abord du déséquilibre existant entre l'ingestion de ces sucres et leur utilisation par les tissus. L'excès de glucose, stocké au niveau du tissu adipeux, du foie et des muscles notamment, perturbe les systèmes de régulation de la glycémie, dont le principal acteur est l'insuline. Il se crée alors une insulino-résistance résultant de la stimulation répétée de ces structures de régulations par l'arrivée massive de glucose au sein de l'organisme.
- Bien que le sucralose et l'Ace-K soient acaloriques, ces molécules possèdent la capacité d'impacter le contrôle de la glycémie en jouant sur les systèmes de régulation de celle-ci par le biais des récepteurs gustatifs sucrés. Toutefois, les données actuelles sur les effets tissulaires du sucralose et de l'Ace-K, isolés ou utilisés en synergie et sur les récepteurs de l'amertume notamment, sont incomplètes. De ce fait, celles-ci ne sont pas suffisantes pour déterminer si ces édulcorants constituent une alternative de choix au sucre, dans la prévention du risque de survenue des maladies cardiométaboliques.



OBJECTIFS ET HYPOTHESES DU TRAVAIL DE THESE

L'une des pistes de réflexion suggérée par les études épidémiologiques pour expliquer l'augmentation d'un plus grand risque de mortalité CV chez les grands consommateurs de boissons édulcorées, est la survenue plus fréquente de maladies circulatoires. Néanmoins, aucun mécanisme sous-jacent direct n'a été identifié pour expliquer ces observations chez l'Homme. Dans ce contexte, l'altération précoce d'une altération de la composante vasculaire peut être envisagée. En effet, l'endothélium vasculaire joue un rôle important dans la régulation de la vasomotricité et est démontrée comme étant très sensible aux excursions glycémiques provoquées par une ingestion de glucides, comme les sucres libres. Cette sensibilité est d'autant plus intéressante que des études chez l'homme et l'animal ont démasqué une altération de l'homéostasie du glucose uniquement lorsqu'un stress hyperglycémique était associé à une ingestion d'un édulcorant.

Objectif ETUDE N°1

Ainsi, dans une première étude, nous avons évalué les effets d'une consommation chronique d'un cocktail d'édulcorants associant Ace-K/sucralose sur la fonction vasculaire aortique dans un modèle de rat sans facteur de risque associé.

Hypothèse ETUDE N°1

L'hypothèse de ce travail était donc qu'une consommation du mélange Ace-K/sucralose pouvait être à l'origine d'une altération de la fonction vasculaire endothéliale, et que ce phénomène pouvait être exacerbé en condition hyperglycémique.

Une altération de la fonction endothéliale vasculaire peut également être retrouvée lorsque l'homéostasie métabolique est altérée telle que c'est le cas chez les patients obèses. Or, les études épidémiologiques récentes montrent une augmentation de l'incidence de l'obésité chez les grands consommateurs de boissons édulcorées. De plus, le risque de mortalité CV serait d'autant plus augmenté que ces consommateurs présenteraient un surpoids ou une obésité. Toutefois, ces études observationnelles ne permettent pas d'identifier précisément les molécules édulcorantes pouvant participer à l'augmentation de ce risque.

En effet, certaines études récentes montrent un effet spécifique de chaque édulcorant sur la composition corporelle ou encore la sensibilité à l'insuline. Cela souligne l'importance d'évaluer la propriété biologique de chaque édulcorant sur les systèmes de régulation du métabolisme, afin

d'amener des éléments de réponse quant à leur utilisation en synergie, comme cela est souvent le cas dans l'alimentation afin de masquer l'amertume dégagée par ces molécules lorsqu'elles sont consommées indépendamment.

Objectif ETUDE N°2

C'est pourquoi, l'objectif de notre deuxième étude a été de caractériser, dans le cadre d'un régime équilibré ou riche en gras, l'effet spécifique d'une consommation de sucralose sur la composition corporelle, le contrôle glycémique et la fonction vasculaire de souris.

Hypothèse ETUDE N°2

Notre hypothèse supportait le fait que la consommation de sucralose pouvait impacter la fonction vasculaire, notamment par le biais de modifications au niveau de la composition corporelle et/ou du contrôle glycémique.

Enfin, au regard des résultats qui se sont montrés contradictoires entre les deux modèles utilisés, potentiellement dû aux deux formulations différentes de boissons utilisées, nous avons conduit des expérimentations complémentaires, afin de mieux comprendre les effets sur le contrôle de la glycémie et la fonction vasculaire. Pour cela nous avons choisi d'utiliser le sucralose et l'Ace-K en prise aigu, afin d'identifier les mécanismes pouvant être responsables des résultats obtenus dans nos deux études.

MATERIELS ET METHODES

1. POPULATIONS

Protocoles expérimentaux des ETUDES 1 et 2 :

Tous les protocoles expérimentaux sont conformes aux Directives Parlementaires Européennes 2010/63/EU (N°CEE-00322.03), et ont été approuvés par le comité d'éthique local (n°2016052711333056). Tous les animaux utilisés lors de ce travail ont été élevés dans des conditions constantes de température ($21^{\circ}\text{C}\pm 1$) et d'humidité ($60\%\pm 10$) avec des cycles de 12 heures de jour et 12 heures de nuit, alternant entre 6h00 à 18h00 (Animalerie LaPEC, EA4278).

a. **ETUDE N°1 : Effet de la consommation chronique d'un cocktail d'édulcorants sur la composition corporelle et la fonction vasculaire chez le rat sain**

L'objectif de l'ETUDE N°1 a été d'étudier à partir d'un modèle de rats consommant un régime standard d'animalerie, l'effet d'une consommation chronique d'un mélange d'Ace-K et de sucralose dans l'eau de boisson, sur les paramètres de composition corporelle et de vasomotricité.

Protocole expérimental :

Une semaine après leur arrivée au laboratoire, les 15 animaux ont été aléatoirement répartis en 3 groupes de 5 animaux chacun :

- **Groupe Contrôle (Water)** : ayant un accès *ad libitum* à un régime standard (A04, SAFE, France) et à un biberon d'eau
- **Groupe Low dose - Artificial Sweetener Beverage (LD-ASB)** : ayant un accès *ad libitum* à un régime standard (A04, SAFE, France) et à un biberon d'eau supplémenté en édulcorants (Ace-K à 0,001% et sucralose à 0,002%), correspondant à une consommation régulière de boissons édulcorées chez l'homme
- **Groupe High dose – Artificial Sweetener Beverage (HD-ASB)** : ayant un accès *ad libitum* à un régime standard (A04, SAFE, France) et à un biberon d'eau supplémenté en édulcorants (Ace-K à 0,015% et sucralose à 0,015%), correspondant à la DJA répertoriée par les instances de santé chez l'Homme (Tableau 2).

Ces animaux ont été soumis à ce régime pendant 10 semaines. La boisson a été changée trois fois par semaine. Pendant les 10 semaines du protocole nutritionnel, un suivi de la masse corporelle

ainsi que de la consommation de nourriture et de boisson consommées a été réalisé. Après un jeun de 14h les animaux de $482,5 \pm 25\text{g}$ en moyenne, ont été anesthésiés avec une injection de pentobarbital sodique (Doléthol, Vétoquinol ; $182,2\text{mg/kg}$, i.p.), et ont reçu une injection d'héparine (9041-08-1, Fisher Scientific ; 315UI/kg , i.v.). L'aorte des animaux a ainsi été prélevée et utilisée pour des tests de vasoréactivité dans des cuves à organe isolé (cf. ETUDE DE LA REACTIVITE VASCULAIRE AORTIQUE EX VIVO, ETUDE N°1, p. 75). Les tissus adipeux sous-cutané, inguinal, épидидymal, péri-rénal et dorsal ont été prélevés et pesés afin de quantifier le degré d'obésité viscérale d'une part, et de caractériser la répartition des masses adipeuses d'autre part (Fig. 21).

Tableau 2 : Composition des régimes de l'ETUDE N°1

NFE : Nitrogen Free Extract = $100 - (\text{H}_2\text{O}) - (\text{Protéines}) - (\text{Lipides}) - (\text{Minéraux}) - (\text{Fibres})$

Composition			
<i>Régime</i>			
Lipides (%)		3,1	
Protéines (%)		16,1	
Carbohydrates (%)		3,37	
Fibres (%)		3,9	
Minéraux (%)		4,5	
NFE (%)		59,9	
Vit. A (UI/kg)		6600	
Vit. D3 (UI/kg)		900	
Vit. E (UI/kg)		30	
<i>Boisson – Eau +</i>			
	Contrôle	LD-ASB	HD-ASB
+ Sucralose (%)	-	0,002	0,015
+ Acesulfame potassium (%)	-	0,001	0,015

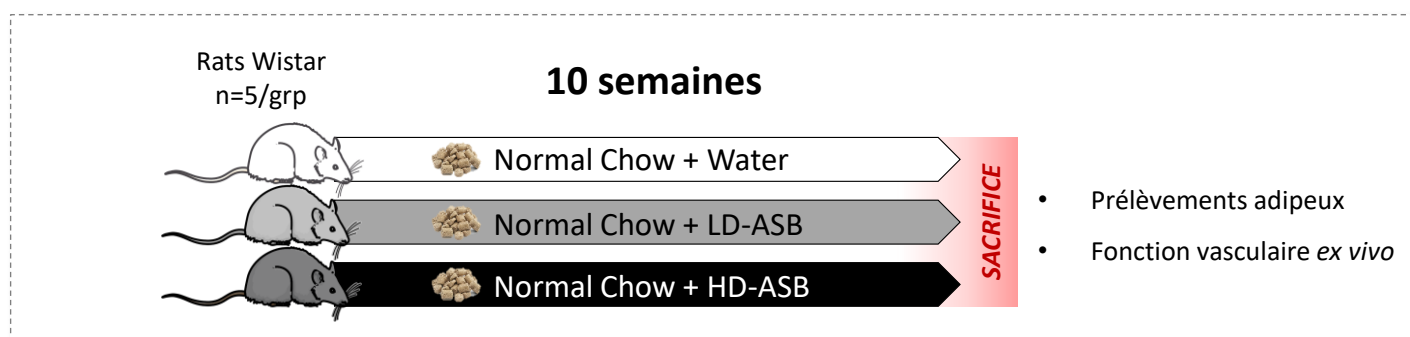


Figure 21 : Protocole expérimental de l'ETUDE N°1

b. ETUDE N°2 : Caractérisation de la consommation chronique d'un édulcorant intense, effet de cette consommation sur la composition corporelle, le métabolisme du glucose et la fonction vasculaire de souris saines ou rendues obèses par un régime riche en graisses.

L'objectif de l'ETUDE N°2 a été dans un premier temps de caractériser les effets d'une consommation chronique de sucralose, ajouté à l'eau de boisson, sur l'évolution de la masse corporelle, le métabolisme du glucose et la fonction vasculaire d'un modèle de souris nourries avec un régime standard d'animalerie ou riche en graisses. Dans un deuxième temps, les mêmes groupes ont été reconduits afin d'évaluer l'effet de ce même régime sur l'activité spontanée ainsi que la capacité d'assimilation intestinale des lipides chez ces souris.

Protocole expérimental 1 :

Une semaine après leur arrivée au laboratoire, un premier lot de 90 souris de 10 semaines d'âge ont été aléatoirement réparties en 6 groupes de 15 souris chacun :

- 3 groupes ayant un accès *ad libitum* à un régime standard (A04, SAFE, France) et à un biberon d'eau, d'eau supplémentée en saccharose à 10% ou d'eau supplémentée en sucralose à 0,017% (correspond à la DJA chez l'Homme) respectivement : groupe Normal Chow + Water (NC-W, contrôle), Normal Chow + Sucrose (NC-S), Normal Chow + Sucralose (NC-Su),
- 3 groupes ayant un accès *ad libitum* à un régime enrichi en gras (230 HF, SAFE, France) et à un biberon d'eau, d'eau supplémentée en saccharose à 10% ou d'eau supplémentée en sucralose à 0,017% respectivement : groupe High Fat + Water (HF-W), High fat + Sucrose (HF-S), High fat + Sucralose (HF-Su) (Tableau 3).

Ces animaux ont été soumis à ce régime pendant 12 semaines. La nourriture et la boisson ont été changées trois fois par semaine. Pendant les 12 semaines du protocole nutritionnel, le suivi de la masse corporelle ainsi que de la consommation de nourriture et de boisson a été réalisé. Après un jeun de 14h, les animaux de 22 semaines d'âge ont été anesthésiés avec une injection de pentobarbital sodique (182,2mg/kg i.p.; Doléthal, Vétoquinol). L'aorte a été prélevée et utilisée pour des tests de vasoréactivité dans des cuves à organe isolé (cf. Etude de la réactivité vasculaire aortique *ex vivo*, ETUDE N°2, p. 75, 77), ou congelée dans de l'azote liquide, avant d'être conservée à -80°C pour des analyses biochimiques ultérieures (cf. Analyses Histologiques et Biochimiques, p. 77). Le sang des animaux a été prélevé et le sérum obtenu compartimenté dans des tubes secs pour la réalisation d'analyses du taux circulant de glucose et d'insuline. Enfin, les tissus adipeux sous-cutané, inguinal,

épididymal, péri-rénal et dorsal ont été prélevés et pesés afin de quantifier le degré d'obésité viscérale d'une part, et de caractériser la répartition des masses adipeuses d'autre part (Fig. 22).

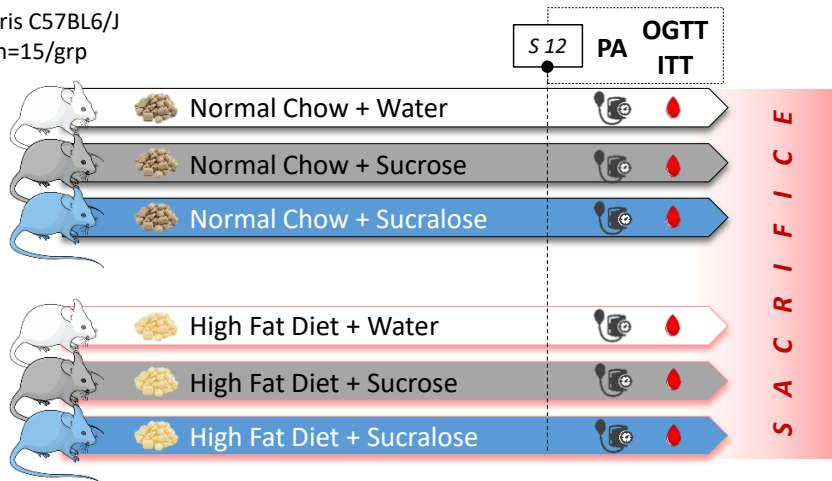
Tableau 3 : composition des régimes de l'ETUDE N°2

NFE : Nitrogen Free Extract = 100-(H₂O)-(Protéines)-(Lipides)-(Minéraux)-(Fibres)

Composition	Standard			Riche en gras		
Régime						
Lipides (%)	3,1			35,8		
Protéines (%)	16,1			17,4		
Carbohydrates (%)	3,37			35		
Fibres (%)	3,9			0		
Minéraux (%)	4,5			5,8		
NFE (%)	59,9			33,3		
Vit. A (UI/kg)	6600			20000		
Vit. D3 (UI/kg)	900			2500		
Vit. E (UI/kg)	30			175		
Boisson – Eau +	NC-W	NC-S	NC-Su	HF-W	HF-S	HF-Su
+ Saccharose (%)	-	10	-	-	10	-
+ Sucralose (%)	-	-	0,017	-	-	0,017

12 semaines

Souris C57BL6/J
n=15/grp



- Evaluation composition corporelle
Caractérisation adipocytaires
- Dosage glucose/insuline
- Fonction vasculaire ex vivo

Figure 22 : Protocole expérimental 1 de l'ETUDE N°2

PA : Pression Artérielle ; OGTT : Oral Glucose Tolerance Test ; ITT : Insulin Tolerance Test

Protocole expérimental 2 :

Dans un deuxième temps, 36 souris de 10 semaines ont été aléatoirement réparties en 6 groupes afin de suivre le même régime que le lot de souris précédent. Cette fois, les animaux ont été soumis à ce régime pendant 5 semaines. Après deux semaines de régime, les fèces des animaux ont été ramassées pour évaluer leur teneur en lipides. L'influence des différents régimes sur l'activité physique spontanée a été évaluée entre la deuxième et la cinquième semaine de régime. Pour ce protocole, chaque souris a été placée dans une cage munie d'une roue pour une durée de 4 jours au total. Après deux jours d'habituation, les valeurs de distance parcourue dans la roue ont été relevées pendant 48 heures. A la fin des 5 semaines de régime, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale (Fig. 23).

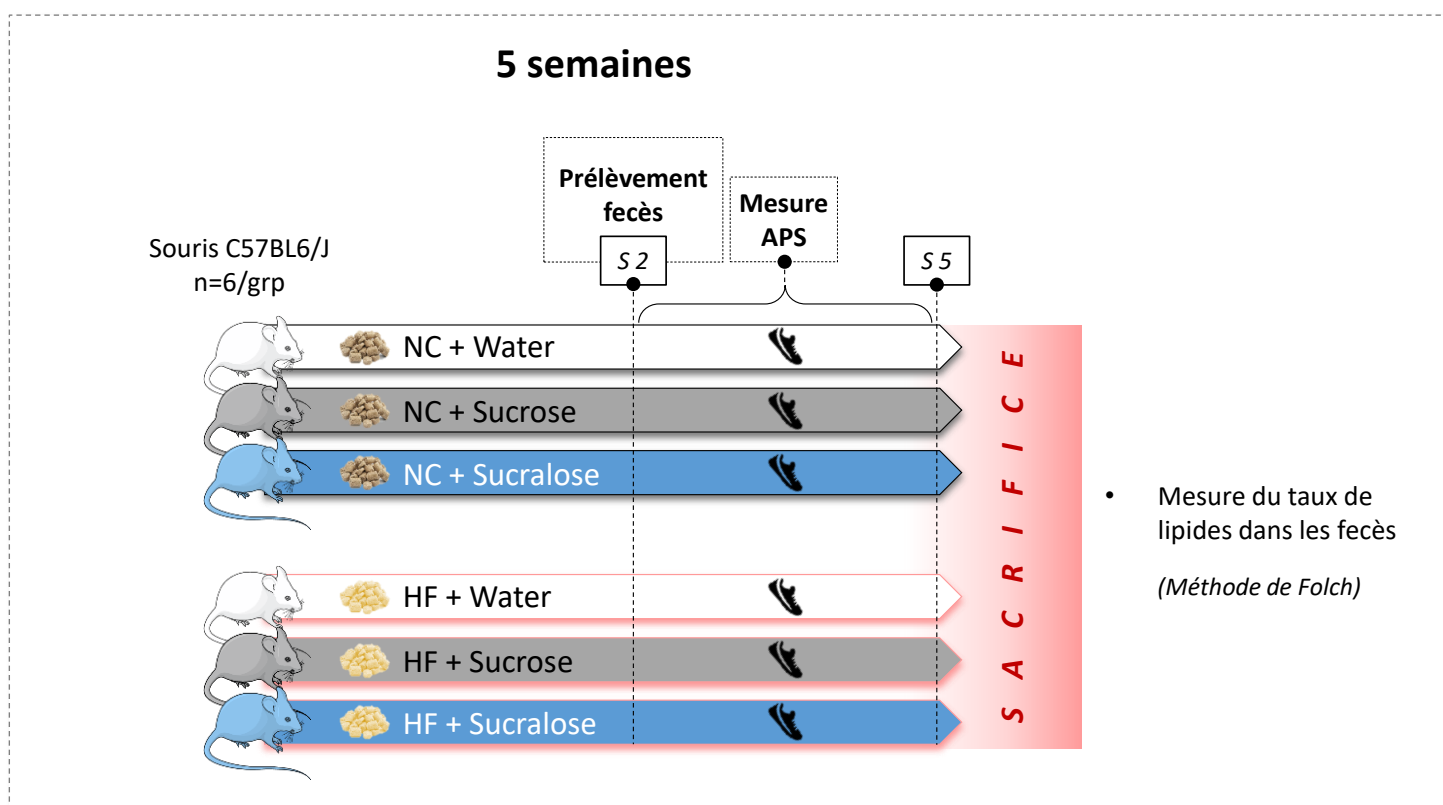


Figure 23 : Protocole expérimental 2 de l'ETUDE N°2

NC : Normal Chow ; HF : High Fat Diet ; APS : Activité Physique Spontanée

2. PARAMETRE BIOLOGIQUE ET PHYSIOLOGIQUE

a. Mesure de la pression artérielle chez la souris

Principe de la mesure de pression artérielle « Tailcuff » :

La pression artérielle a été mesurée à l'aide du système CODA-2, selon une méthode non invasive dite « Tail-cuff » (Kent Scientific) (Fig. 24). Deux brassards ont été nécessaires, un premier brassard d'occlusion placé à la base de la queue, et un second placé de manière plus distale. Le premier brassard a été gonflé à une pression supra-systolique (250mmHg) afin de stopper la circulation sanguine au niveau de l'artère caudale, puis a été dégonflé progressivement. Ainsi, le second brassard capte les variations de flux sanguin en fonction du volume de la queue de la souris. La pression systolique a automatiquement été détectée lorsque la pression appliquée par le brassard d'occlusion n'a plus suffi à bloquer la circulation sanguine au niveau de la queue. La pression diastolique a été déterminée lorsque le volume sanguin a cessé d'augmenter au niveau de l'artère caudale.

Protocole expérimental :

Quinze minutes avant chaque série de mesure, les souris ont été placées en couveuse à 37°C afin d'induire une vasodilatation périphérique, facilitant la mesure de la pression artérielle. Les souris ont été maintenues dans un tube de contention positionné sur une plaque chauffante afin de conserver une température corporelle stable. Quinze cycles de mesures ont été réalisés sur chaque animal, les cinq premiers n'étant cependant pas comptabilisés car considérés comme une phase d'adaptation pour la souris. Les valeurs de pression systolique et diastolique obtenues ont été le résultat d'une moyenne d'au moins cinq valeurs de pressions. Ces mesures ont été réalisées au cours de l'ETUDE N°2, pendant les semaines 11 et 12 du régime.

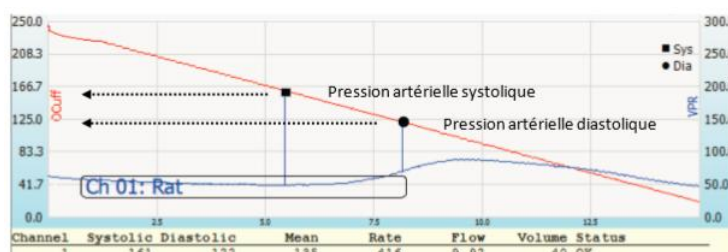


Figure 24 : Mesure de la pression artérielle sur système CODA par méthode « Tail-cuff »

b. Etude du contrôle de la glycémie chez le rat et la souris

i. Régulation de la glycémie

Principe du test de tolérance au glucose :

Ce test consiste à administrer une importante concentration de glucose à un individu afin d'observer la capacité de l'organisme à réguler cette HG. Lorsque le sujet possède une bonne tolérance au glucose la glycémie est rapidement contrôlée, tandis que chez un individu intolérant au glucose le pic de glycémie est plus élevé et l'HG est persistante.

Protocole expérimental :

Un jeûne de 14 heures (de 18h00 à 8h00) a été imposé aux animaux avant le test. Les prélèvements sanguins ont été réalisés sur la veine caudale, à l'aide d'une incision à l'extrémité de la queue. Un lecteur de glycémie (Caresens N ; I sens) a permis la mesure de la concentration de glucose circulant, tout d'abord à jeun, puis aux temps $t=10, 20, 30, 45, 60, 90, 120$ minutes après l'HG (1,5g/kg) induite par gavage oral.

ii. Evaluation de l'insulino-résistance

Principe du test de tolérance à l'insuline :

Le test de tolérance à l'insuline permet d'évaluer la capacité de l'insuline à stimuler la captation de glucose par les différents tissus insulino-sensibles, reflétant ainsi la sensibilité tissulaire à cette hormone. En pratique, l'insuline est injectée par voie intra-péritonéale puis la glycémie est mesurée régulièrement afin de suivre son évolution. Chez un individu insulino-sensible la glycémie est rapidement diminuée et mettra un certain temps à revenir à la normale, alors que chez un individu insulino-résistant la glycémie n'est que très faiblement diminuée, traduisant ainsi l'inefficacité de l'insuline.

Protocole expérimental :

Après une période de jeûne de 6 heures (de 8h00 à 14h00), une première prise de glycémie a été réalisée sur la veine caudale grâce à une incision au niveau de l'extrémité de la queue. Ensuite les animaux ont reçu une dose d'insuline correspondant à 1 UI/kg par injection intra-péritonéale, puis la glycémie a été mesurée à $t=10, 20, 30, 45, 60, 90$ et 120 minutes.

3. ETUDE DE LA REACTIVITE VASCULAIRE AORTIQUE EX VIVO

Chez le rongeur, après une thoracotomie, le bloc cœur-aorte a été prélevé et immergé rapidement dans une solution à 4°C de Krebs-Henseleit (KH) (concentration en mM pour l'aorte de rat (ETUDE N°1) : 118 NaCl ; 4,7 KCl ; 1,2 MgSO₄ ; 1,2 KH₂PO₄ ; 25 NaHCO₃ ; 11 Glucose ; 2,5 CaCl₂ ; concentration en mM pour l'aorte de souris (ETUDE N°2) : 118 NaCl ; 5,3 KCl ; 2,5 MgSO₄ ; 1,2 KH₂PO₄ ; 25 NaHCO₃ ; 11 Glucose ; 1,7 CaCl₂). L'aorte a ensuite été isolée, le PVAT retiré minutieusement, et enfin coupée en anneaux d'environ 2 mm de longueur pour le rat et la souris.

Les anneaux d'aortes ont été montés entre deux crochets métalliques, l'un fixe et l'autre relié à un capteur de force isométrique EMKA® dans une cuve à organe isolé contenant une solution de KH (Fig. 25). Le signal, transmis à un amplificateur, a ensuite été traité informatiquement par le logiciel d'acquisition IOX®. Le liquide de KH a été chauffé à 37 °C, et du carbogène (95% O₂, 5% CO₂) a été apporté par bullage, assurant un pH de 7,4 stable et une oxygénation suffisante. Les anneaux d'aorte ont ensuite été équilibrés pendant une heure à une tension de 2g et 0,8g chez le rat et la souris respectivement.

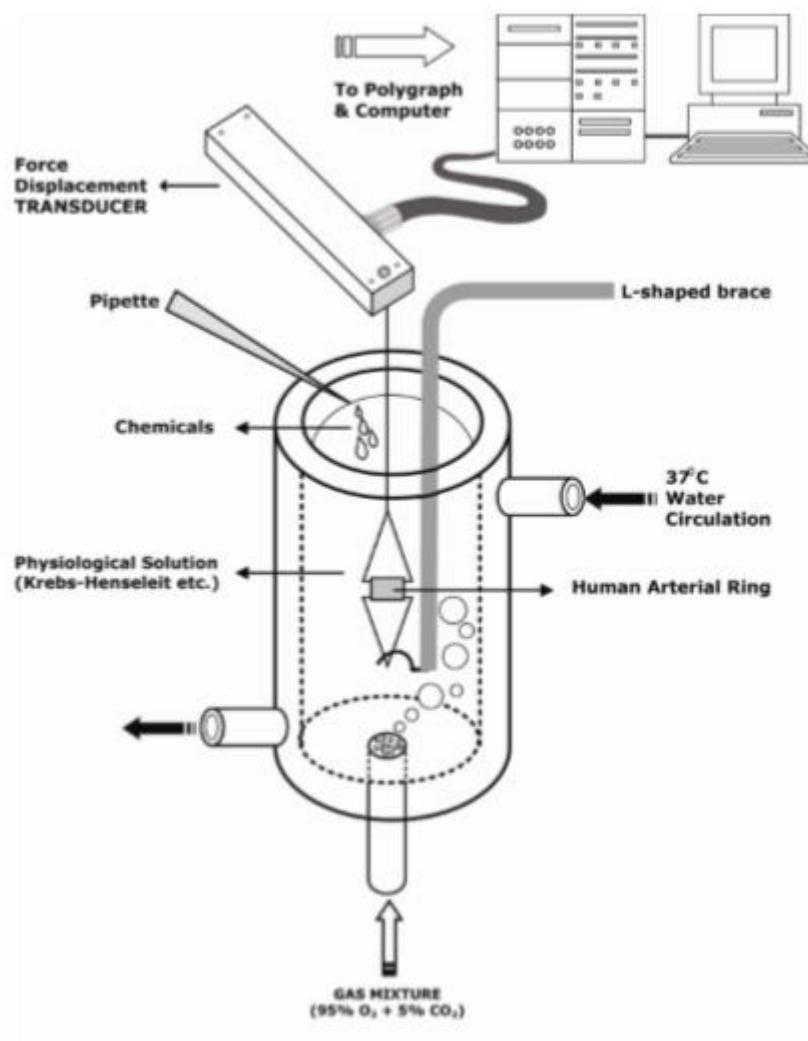


Figure 25 : Fonctionnement du système de mesure de la réactivité vasculaire schématique d'une cuve à organe isolé et de son fonctionnement.

Reproduit de Yildiz, Seyrek et Gul, 2013.

a. Protocole expérimental ETUDE N°1

Après la période de stabilisation des anneaux, un test d'intégrité a été réalisé, permettant de vérifier que l'endothélium n'ait pas été lésé durant le montage. Pour cela une dose d'acétylcholine (ACh, 1.10^{-5} M) a été injectée sur les anneaux d'aorte pré-contractés à la phényléphrine (PE, 1.10^{-6} M). Afin de confirmer une deuxième fois l'intégrité de ces vaisseaux, une dose-réponse vasodilatatrice à l'ACh (1.10^{-9} M à 3.10^{-5} M) a été réalisée à la suite du test d'intégrité sur les anneaux pré-contractés à la PE (1.10^{-6} M) afin d'évaluer les capacités de relaxation induite par l'endothélium. Seuls les anneaux capables de se relâcher d'au moins 60% de la contraction maximale atteinte avec la PE ont été inclus dans l'analyse statistique. Suite à cela, nous avons testé la réponse vasodilatatrice de l'endothélium provenant d'animaux ayant consommé ou non des édulcorants, en condition normoglycémique (NG,

11 mM de glucose) ou dans le cadre d'un stress hyperglycémique (HG, 100 mM de glucose). Les anneaux ont donc été incubés pendant une heure dans un KH enrichi ou non en glucose (KH-HG, 100mM vs. 11mM de glucose) puis une dose-réponse vasodilatatrice à l'ACh (1.10^{-9} M à 3.10^{-5} M) a été réalisée. Enfin, dans le but d'évaluer l'impact de ce stress d'une heure sur les CMLV, nous avons injecté à la fin de la procédure une dose maximale de sodium nitro-prussiate (SNP, 1.10^{-4} M), un donneur de NO permettant d'observer la capacité maximale de relaxation des anneaux.

b. Protocole expérimental ETUDE N°2

Après la période de stabilisation des anneaux, le KH est remplacé par un KH chargé en KCl à hauteur de 125mM permettant d'observer la contraction « maximale » pouvant être atteinte par le vaisseau via la dépolarisation des membranes des CMLV. Suite à cela, un test d'intégrité (ACh 1.10^{-5} M suivi de PE 1.10^{-6} M) a été réalisé. Une fois ces pré-tests effectués, le protocole de mesure a pu être réalisé.

Les anneaux ont été incubés une heure dans un KH NG (11mM de glucose) ou HG (100mM de glucose). Ensuite, une dose-réponse contractile à la PE (1.10^{-9} à 1.10^{-5} M) a été réalisée, afin de tester la capacité de contraction des anneaux d'aorte en présence d'un agoniste α -adrénergique. Après l'atteinte d'une contraction maximale induite par la dernière concentration de PE, une dose-réponse vasodilatatrice à l'ACh (1.10^{-9} M à 3.10^{-5} M) a été réalisée, puis les anneaux ont été mis en présence de SNP (1.10^{-4} M) à la fin de la dose-réponse, un donneur de NO permettant d'observer la capacité maximale de relaxation des anneaux.

4. ANALYSES HISTOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES

a. Dosage des protéines

L'évaluation de la concentration en protéines des échantillons a été réalisée avec un kit de dosage BCA (Bicinchonidic acid) (Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific). Le principe de ce dosage repose sur l'association du BCA aux ions Cu^+ , obtenus par la réduction d'ion Cu^{2+} par les protéines présentes dans l'échantillon. Le complexe BCA- Cu^+ présente une forte absorbance à 562nm, proportionnelle à la concentration protéique de l'échantillon. Ainsi, grâce à une gamme étalon BSA (*Bovine Serum Albumin*) de concentration protéique connue (de 0 à 2mg/mL), la concentration en protéine de chaque échantillon a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 562 nm.

b. Dosage des taux d'insuline sérique

Afin de mesurer le taux d'insuline sérique nous avons utilisé le Kit INSULIN ELISA (10-1247-01, MERCODIA). L'utilisation de ce kit nous a permis d'évaluer l'impact de nos conditions expérimentales sur le profil sécrétoire de l'insuline sérique. Il utilise un anticorps de capture (*mouse insulin capture antibody*), spécifique de l'insuline, et un anticorps secondaire couplé à un agent de détection (*mouse insulin detector antibody*) permettant le dosage de l'insuline dans l'échantillon. Les puits sont coâtés par des anticorps permettant la fixation du complexe formé au préalable (anticorps spécifique de l'insuline/insuline/anticorps secondaire).

Pour réaliser ce kit, les échantillons sont déposés dans une plaque de 96 puits, auxquels on rajoute ensuite le cocktail d'anticorps. Après incubation, les puits sont lavés afin d'éliminer les molécules qui ne seraient pas restées fixées. Le substrat est alors déposé dans les puits permettant, après catalyse par l'enzyme HRP (*Horseradish peroxidase*), d'observer une coloration violacée. Cette réaction est ensuite stoppée par ajout d'une solution stop. Le signal obtenu est alors proportionnel au taux d'insuline ou de leptine présent dans le milieu, et l'intensité du signal est mesuré à 450 nm. Afin de normaliser la quantification protéique de nos échantillons, un dosage BCA (voir Dosage des protéines, p. 77) a été effectué sur ces échantillons. Les mesures ont été réalisées en duplicata.

c. Caractérisation du tissu adipeux épидидymal et inguinal par histologie

Une fois prélevés, les tissus adipeux inguinal et épидидymal ont été fixés dans de la formaline 10% pendant au moins 48 heures, puis rincés 48 heures dans une solution de PBS. Les échantillons ont ensuite été transférés dans des bains successifs de titre croissant allant de 25 à 100% d'éthanol pour déshydratation, avant d'être inclus en bloc de paraffine (Robot processeur de tissus STP120) puis mis en cassette (EC350). Enfin, des coupes de 10 µm d'épaisseur ont été effectuées à l'aide d'un microtome (Leica MR2125RTS) permettant ainsi la phase d'immuno-marquage de ces échantillons. Pour ce faire, les coupes ont d'abord été déparaffinées dans un four à chaleur sèche 30 minutes à 60°C, avant leur passage successif dans des bains de xylène pour nettoyage (Histoclear) puis d'éthanol. Ensuite, les échantillons ont été rincés à deux reprises dans du PBS 1X pendant 5 minutes, puis plongés dans une solution d'hématoxyline (Cat# HHS15, Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes. Les étapes de rinçages ont ensuite été répétées, à raison de deux rinçages successifs au PBS 1X pendant 5 minutes, suivis de bains successifs d'éthanol, pour enfin être plongés dans une solution d'éosine (Cat# HT110132, Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes. Enfin, suite à une dernière étape de rinçage comme décrite ci-dessus, les lames ont été montées dans un milieu de montage à base de toluène (Cat# HT14800, Electron Microscopy Sciences), pour ensuite être observées et photographiées avec un microscope binoculaire

(Nikon Multizoom AZ100). La taille des adipocytes (n=9 par coupe) a été déterminée grâce à une plateforme d'analyse spécifique (Adipocyte Tool, ImageJ, NIH).

d. Evaluation du taux d'assimilation des lipides issus de fèces de souris

Les fèces ont été prélevées 24 heures après le dernier change et cette opération a été répétée jusqu'à l'obtention d'une masse suffisante d'échantillon pour le protocole. Ainsi, un gramme de fèces a été homogénéisé dans un premier falcon 50mL (F1) contenant 20mL d'un mélange de solvant (chloroforme/méthanol (2/1) + 0.05% d'HCl 0,1N) à l'aide d'un ultra turrax. Afin de rincer l'échantillon, 4mL de NaCl 0,9% ont été ajoutés aux 20mL déjà présents dans le F1 avant d'être vortexé. Les tubes ont ensuite été centrifugés 10 minutes à 2000 RPM (Jouan) à 4°C afin de faire apparaître les deux phases de chaque échantillon. La phase inférieure chloroformique, contenant les lipides, a alors été récupérée et passée dans un nouveau falcon 50mL (F2). Afin de récupérer l'entièreté des lipides de l'échantillon, le même protocole a été répété une seconde fois sur le F1, après ajout de 14mL de chloroforme, afin de rajouter la phase inférieure obtenue à celle récupérée préalablement dans le F2. Ensuite, dans un souci de pureté de l'échantillon, le F2 a subi une étape de lavage, consistant à l'ajout de 6mL de NaCl suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 2000 RPM à 4°C. La phase chloroformique obtenue a été récupérée et transférée dans un tube en verre de 7 ou 10mL, préalablement pesé à vide. Suite à cela, les différents échantillons ont été mis à sécher sous azote. Chaque tube a enfin été pesé afin d'évaluer la quantité de lipides séchés pour chaque échantillon.

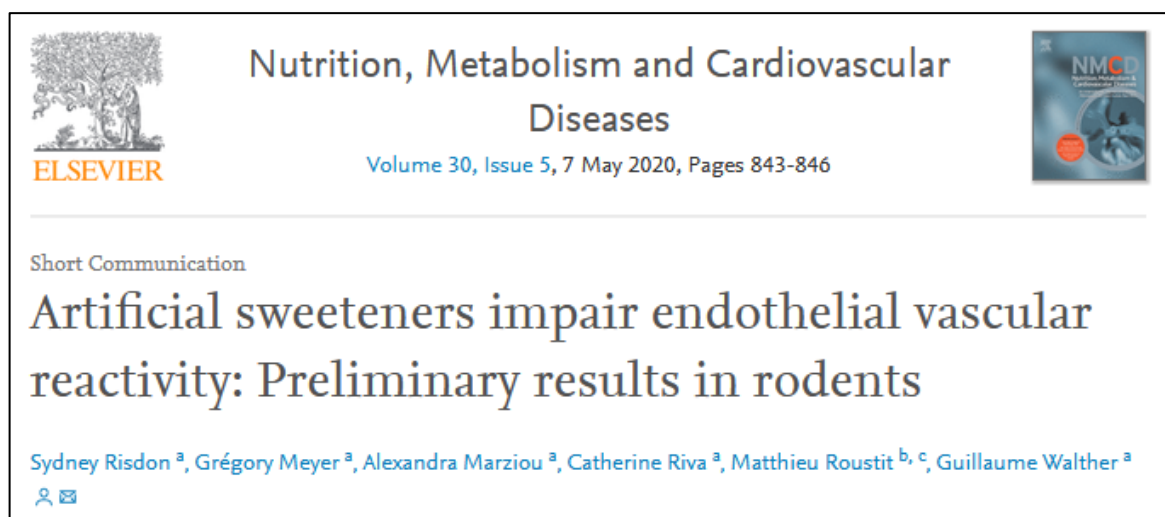
5. ANALYSES STATISTIQUES

Tous les résultats sont présentés sous formes de moyennes $\pm$ l'erreur standard à la moyenne (SEM). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Graph Pad Prism 8.0 (La Jolla Californie, USA). Les effets des différentes conditions expérimentales et leurs interactions ont été évalués par une analyse de la variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs. Des ANOVA à mesures répétées ont été utilisées afin d'analyser les tests de tolérance au glucose et à l'insuline ainsi que les différentes doses-réponses utilisées lors de l'étude de la vasomotricité artérielle. En cas d'interaction entre différents facteurs, un test post-hoc a été réalisé (Turkey ou Bonferroni selon les données considérées). Pour l'ensemble des tests statistiques réalisés lors de ce travail, le seuil de significativité retenu était $p \leq 0,05$.

RESULTATS

ETUDE N°1

LES EDULCORANTS AFFECTENT LA REACTIVITE VASCULAIRE ENDOTHELIALE : RESULTATS PRELIMINAIRE CHEZ LE RAT





SHORT COMMUNICATION

Artificial sweeteners impair endothelial vascular reactivity: Preliminary results in rodents

Sydney Risdon^a, Grégory Meyer^a, Alexandra Marziou^a, Catherine Riva^a,
Matthieu Roustit^{b,c}, Guillaume Walther^{a,*}^aAvignon University, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France^bUniv. Grenoble Alpes, Inserm U1042, 38000 Grenoble, France^cGrenoble Alpes University Hospital, Clinical Pharmacology, Inserm CIC1406, 38000 Grenoble, France

Received 30 August 2019; received in revised form 24 January 2020; accepted 27 January 2020

Handling Editor: A. Siani

Available online 12 February 2020

KEYWORDS

Artificial sweeteners;
Vascular reactivity;
Endothelium;
Metabolic disease**Abstract** *Background and aims:* Prospective epidemiological studies highlighted recently the link between artificial sweeteners (AS) consumption and the risk of developing cardiometabolic diseases. However, underlying mechanisms remain unknown. Thus, the aim of this preliminary study was to characterize, in a healthy rat population, the effect of chronic AS consumption on body composition and vascular function, an early marker for cardiovascular disease.*Methods and results:* Healthy Wistar rats followed a 10-week standard diet including the consumption of water sweetened or not with a sucralose/acesulfame potassium solution at different concentrations: for moderate consumption at 1 and 2 mg.kg⁻¹.day⁻¹, respectively or high intake at 15 and 15 mg.kg⁻¹.day⁻¹ for both molecules (acceptable daily intake). Body fat composition has been evaluated and *ex vivo* aortic vasomotor function has been investigated with a pharmacological approach.*Conclusion:* Both groups of AS-treated rats showed a significant increase in subcutaneous and perirenal adipose tissue mass storage, without changes in total body mass. However, rats that have consumed AS at Acceptable Daily Intake (ADI) concentration revealed a significant vascular endothelial dysfunction compared to other groups. These results are interesting because they will help to better explain the observed increase in cardiometabolic risk.

© 2020 The Italian Society of Diabetology, the Italian Society for the Study of Atherosclerosis, the Italian Society of Human Nutrition, and the Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Cardiovascular disease (CVD) is the single leading cause of death among those with obesity and type 2 diabetes (T2D) [1]. Although these worsening trends are driven by a complex interaction between numerous lifestyle and

socioeconomic factors, it is now well accepted that habitual excess sugar consumption is the dietary factor that is most consistently found to be associated with obesity or T2D [2,3]. Moreover, Malik et al. recently reported a positive, dose-dependent association between sugary drinks consumption and CVD mortality [4].

As an alternative, artificial sweeteners (AS) have been increasingly used in food and beverages to replace high-energy, added sugars. By providing consumers with products that have a sweet taste and low-energy content,

* Corresponding author. Avignon University, Faculty of Sciences LAPEC EA4278, 74 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France. Fax: +334 90 16 29 01.

E-mail address: guillaume.walther@univ-avignon.fr (G. Walther).

AS appear to be the magic bullet to enhance weight loss and reduce cardiometabolic diseases. Indeed, AS (e.g. sucralose (Su), acesulfame potassium (AceK), saccharin, aspartame or stevia among others) are products that maintain perceived sweetness, without increasing caloric intake [5]. As a consequence, AS consumption does not acutely significantly change blood glucose concentration in healthy adults or in those with T2D [6]. These results encouraged health authorities to recommend AS consumption, as part of a weight loss strategy in overweight and obese individuals, and in patients with glucose intolerance or diabetes [7]. In addition, the European Food Safety Authority and the United States Food and Drug Administration, have approved several AS safe for human consumption [8].

Despite the apparent neutral effects of AS on blood glucose, there is still a strong debate questioning their physiological inactivity and their long-term effect on human health [9]. Indeed, several recent epidemiological and descriptive studies have reported significant associations between the consumption of AS and weight gain, increased incidence of T2D and CV events [9–11]. Recently, an increased risk in total and CVD mortality has been identified in women consuming four or more AS beverage servings per day, but not in mixed-gender subjects drinking moderately [4,12]. However, the interpretation of these data is difficult because AS are typically consumed by individuals already suffering from obesity or cardiometabolic conditions. Very few prospective, randomized, controlled studies have assessed the effect of these molecules consumption on human health, highlighting the urgent need for more research into this question [13].

As the mechanisms through which artificial sweetened beverages (ASB) may be harmful on cardiovascular health remain unknown, we conducted a preliminary experimental study in rats focusing on the effects of chronic ASB consumption on vascular function. Indeed, vascular dysfunction is a well-recognized, early biomarker of atherosclerosis and a key contributor to the onset and progression of CVD. It could therefore explain health issues associated with AS consumption.

All animal experiments were performed according to the European Parliament Directive and approved by the local research ethics committee. Adult Wistar rats (Janvier Labs, France) underwent 10 weeks of a normal chow diet (A04, SAFE, France), supplemented by ad libitum water or ASB. Su and AceK, both high intensity sweeteners were used in this protocol because they are the most used sweeteners in overall foods and beverages (accounting for 62% of the global artificial sweetener market). To assess the health effect of a daily consumption of AS, we provided Su and AceK at low (LD-ASB) concentrations, closely following Young et al. study that reported ASB metabolic impact in human and corresponding to moderate user consumption (1 and 2 mg.kg⁻¹.day⁻¹, respectively) [14]. ASB effect at a high (HD-ASB) dose was also studied, reaching the maximal limit of ADI, (15 mg.kg⁻¹.day⁻¹ for both Su and AceK), respectively [15]. At the end of the diet period, rats were

sacrificed to collect adipose tissues and aorta (Fig. 1A). Aortic rings (2 mm) were placed into an isometric force transducer. After a 1-h incubation in either normoglycemic (NG) (11 mM) or hyperglycemic condition (HG) (100 mM), rings were constricted with phenylephrine and endothelium-dependent vasodilatation was tested using increasing doses of Acetylcholine. For comparison of multiple experimental conditions, analysis of variance (ANOVA) or repeated-measures ANOVA followed by Tukey's test were used. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was done using GraphPad Prism version 8 (GraphPad Software Inc.).

No difference was observed regarding vasodilatory function in a NG condition. However, after 1-h hyperglycemic stress, endothelial function in both ASB groups was impaired compared to control group, although statistical significance was reached only with HD-ASB (Fig. 1B). When expressed as a difference between NG and HG conditions, we observed a two-fold higher decrease in maximal relaxation in HD-ASB than in water group (Fig. 1C). Interestingly, we reported significant changes in adipose tissue deposition of both ASB groups, with increased subcutaneous and visceral perirenal fat mass (Fig. 1E), while total body weight remained comparable between the three groups (Fig. 1D).

As part of a weight loss strategy in overweight and obese individuals and in patients with glucose intolerance or type 2 diabetes, several health authorities or medical practitioners recommend the use of ASB consumption [7]. Nevertheless, there is no consensus regarding the safety of these molecules and further studies are needed to understand their metabolic impact on healthy subjects or patients with cardiometabolic disease. Our experiments conducted in rats showed, for the first time, that commonly used AS in food or drinks (Su and AceK) induced a decrease in endothelium-dependent vascular function in a HG condition. This is of high interest, because we recently demonstrated that acute hyperglycemic stress induced by a commercial sugary drink impaired vascular endothelial function reactivity in healthy young adults; thus confirming the high sensitivity of vascular function to the disruption of glucose metabolism [16]. Therefore, the present study suggests that AS consumption could increase vascular dysfunction in response to a glucose load. Moreover, this vascular dysfunction was also associated with a significant modification in adipose tissue repartition in the body, supporting the hypothesis that AS are able to affect body homeostasis, potentially explaining the increase in cardiometabolic risk observed in epidemiological studies [9–11]. However, the literature is not clear about AS effects on adipose tissue, describing deleterious or neutral effects depending on the study [17,18]. In human overweight and obese population, recent work described positive effects of AS, by limiting weight gain [19]. Whether these changes are found in humans by a direct or indirect effect of AS on vascular function, and whether age and sex may affect the clinical findings [4,12], remain to be determined. The discrepancies observed between

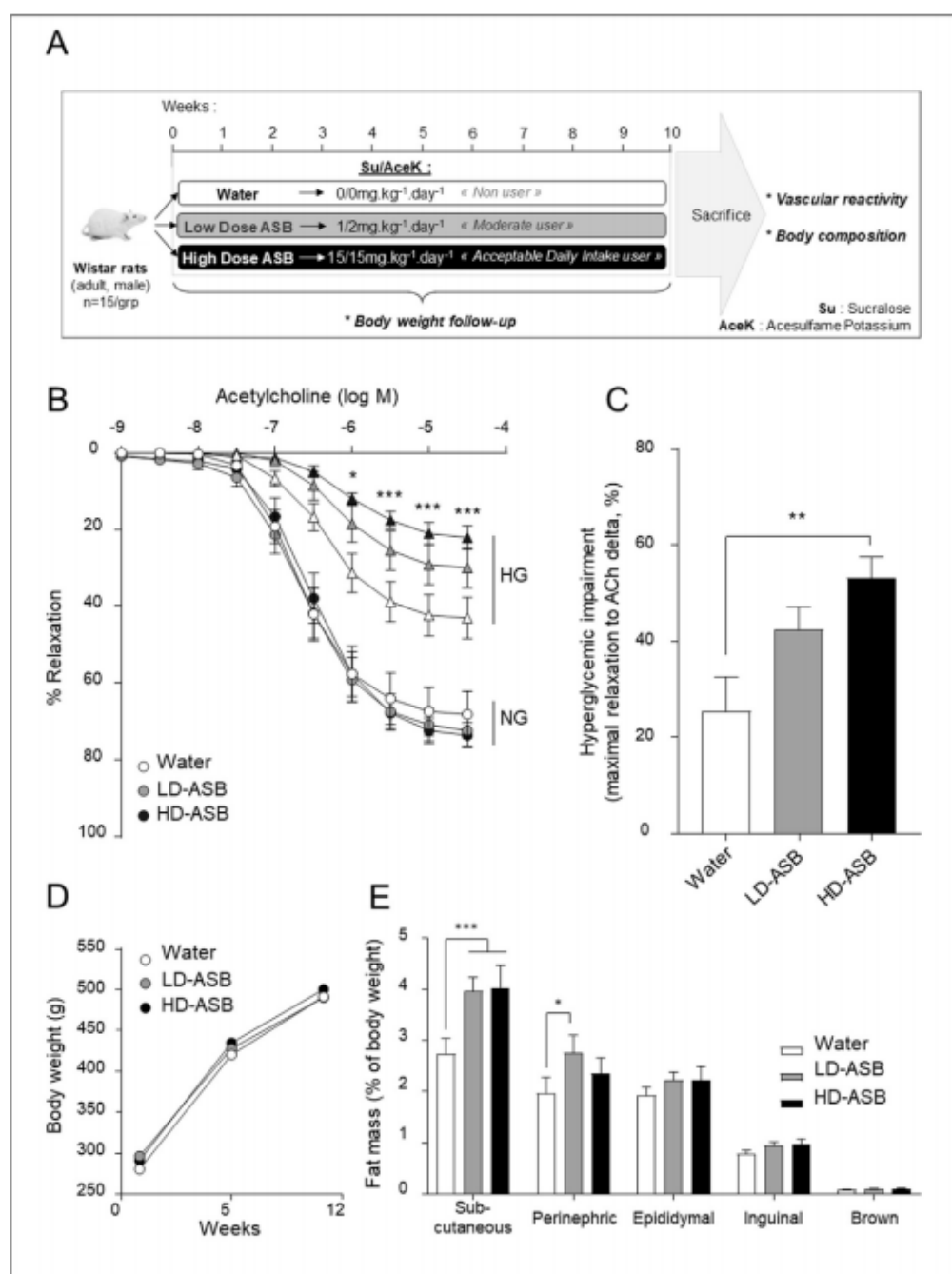


Figure 1 Impact of chronic artificial sweeteners consumption, at moderate and Acceptable Daily Intake, on endothelial dysfunction during acute hyperglycemia. **A**) Diet protocol for rat fed with normal chow and that consumed water supplemented or not (Water) with artificial sweeteners at low (LD-ASB) or high (HD-ASB) dose, respectively, mimicking moderate and Acceptable Daily Intake consumption. After 10 weeks of diet and body weight follow-up, animals are sacrificed for vascular reactivity and body composition assessment. **B**) Endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine (ACh) in rat aorta following 1 h of NG condition (11 mM glucose) or hyperglycemic stress (100 mM glucose). **C**) Maximal relaxation delta between NG and HG condition. **D**) Body weight following 10-week diet. **E**) Body weight percentage of visceral (perirenal, epididymal, and inguinal), subcutaneous, and brown adipose tissue. Data are represented as Mean $\pm$ SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

human and animal studies suggest that more studies are needed to understand AS cardiovascular effects in a healthy population, but also in patients with metabolic disease.

Acknowledgements

Sydney Risdon is supported by a Provence Alpes Cote d'Azur Régional PhD grant.

References

- [1] NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet Lond Engl* 2016;387:1513–30. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00618-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8).
- [2] Arsenault BJ, Lamarche B, Després J-P. Targeting overconsumption of sugar-sweetened beverages vs. Overall poor diet quality for cardiometabolic diseases risk prevention: place your bets! *Nutrients* 2017;9. <https://doi.org/10.3390/nu9060600>. pii:E600.
- [3] Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després J-P, Hu FB. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation* 2010;121:1356–64. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876185>.
- [4] Malik VS, Li Y, Pan A, De Koning L, Schernhammer E, Willett WC, et al. Long-term consumption of sugar-sweetened and artificially sweetened beverages and risk of mortality in US adults. *Circulation* 2019;139:2113–25. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037401>.
- [5] Wang Q-P, Browman D, Herzog H, Neely GG. Non-nutritive sweeteners possess a bacteriostatic effect and alter gut microbiota in mice. *PloS One* 2018;13:e0199080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199080>.
- [6] Tucker RM, Tan S-Y. Do non-nutritive sweeteners influence acute glucose homeostasis in humans? A systematic review. *Physiol Behav* 2017;182:17–26. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.09.016>.
- [7] Shwartz-Slavin C, Swift C, Ross T. Nonnutritive sweeteners: where are we today? *Diabetes Spectr* 2012;25:104–10. <https://doi.org/10.2337/diaspect.25.2.104>.
- [8] EU Sci Hub - Eur Comm. Sugars and sweeteners. 2017. <https://ec.europa.eu/jrc/en/health-knowledge-gateway/promotion-prevention/nutrition/sugars-sweeteners>. [Accessed 25 March 2019].
- [9] Pepino MY. Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiol Behav* 2015;152:450–5. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.024>.
- [10] Azad MB, Abou-Setta AM, Chauhan BF, Rabbani R, Lys J, Copstein L, et al. Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Can Med Assoc J* 2017;189:929–39. <https://doi.org/10.1503/cmaj.161390>.
- [11] Fagherazzi G, Gusto G, Affret A, Mancini FR, Dow C, Balkau B, et al. Chronic consumption of artificial sweetener in packets or tablets and type 2 diabetes risk: evidence from the E3N-European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Ann Nutr Metab* 2017;70:51–8. <https://doi.org/10.1159/000458769>.
- [12] Mossavar-Rahmani Yasmin, Kamensky Victor, Manson JoAnn E, Silver Brian, Rapp Stephen R, Haring Bernhard, et al. Artificially sweetened beverages and stroke, coronary heart disease, and all-cause mortality in the Women's health initiative. *Stroke* 2019;50:555–62. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.118.023100>.
- [13] Risdon S, Roustit M, Meyer G, Walther G. Is fasting blood glucose a reliable parameter to investigate the effect of non-nutritive sweeteners on glucose metabolism? *Eur J Clin Nutr* 2018;73:331–2. <https://doi.org/10.1038/s41430-018-0366-9>.
- [14] Young RL. Impact of artificial sweeteners on glycaemic control in healthy humans. 2017. <http://www.abstractsonline.com/pp8/#!/4294/presentation/4521>. [Accessed 28 November 2017].
- [15] Schiffman SS, Rother KL. Sucralose, A synthetic organochlorine sweetener: overview of biological issues. *J Toxicol Environ Health Part B* 2013;16:399–451. <https://doi.org/10.1080/10937404.2013.842523>.
- [16] Loader J, Meziat C, Watts R, Lorenzen C, Sigauco-Roussel D, Stewart S, et al. Effects of sugar-sweetened beverage consumption on microvascular and macrovascular function in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:1250–60. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308010>.
- [17] Glendinning JL, Hart SA, Lee H, Maleh J, Ortiz G, Sang Ryu Y, et al. Low calorie sweeteners cause only limited metabolic effects in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2019;318:70–80. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00245.2019>.
- [18] Sánchez-Tapia M, Martínez-Medina J, Tovar AR, Torres N. Natural and artificial sweeteners and high fat diet modify differential taste receptors, insulin, and TLR4-mediated inflammatory pathways in adipose tissues of rats. *Nutrients* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/nu11040880>. pii:E880.
- [19] Higgins KA, Mattes RD. A randomized controlled trial contrasting the effects of 4 low-calorie sweeteners and sucrose on body weight in adults with overweight or obesity. *Am J Clin Nutr* 2019;109:1288–301. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy381>.

ETUDE N°2

EFFETS DE LA CONSOMMATION CHRONIQUE D'EDULCORANTS SUR LE METABOLISME DU GLUCOSE ET LA FONCTION VASCULAIRE CHEZ LA SOURIS INDUITE-OBÈSE

EFFECT OF CHRONIC SUCRALOSE CONSUMPTION ON GLUCOSE METABOLISM AND VASCULAR FUNCTION IN OBESE-INDUCED MICE

S Risdon, MSc^{1*}, S Battault, PhD^{1*}, M Paillargue, MSc¹, S Gayrard, BSc¹, P de Santa-Barbara, PhD², G Meyer, PhD¹, G Walther, PhD¹

1. *Avignon University, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France*
2. *PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, 34295 Montpellier cedex 5, France.*

* the authors equally contributed to this manuscript.

EFFECT OF CHRONIC SUCRALOSE CONSUMPTION ON GLUCOSE METABOLISM AND VASCULAR FUNCTION IN OBESE-INDUCED MICE

S Risdon, MSc^{1*}, S Battault, PhD^{1*}, M Paillargue, MSc¹, S Gayrard, BSc¹, P de Santa-Barbara, PhD², G Meyer, PhD¹, G Walther, PhD¹

1. *Avignon University, LAPEC EA4278, F-84000, Avignon, France*
2. *PhyMedExp, University of Montpellier, INSERM U1046, CNRS UMR 9214, 34295 Montpellier cedex 5, France.*

*** the authors equally contributed to this manuscript.**

Correspondence address:

Laboratoire de Pharm-Ecologie Cardiovasculaire

Faculté des Sciences, 33 rue Louis Pasteur 84000 Avignon

e-mail: guillaume.walther@univ-avignon.fr

Number of figures: 4

Number of supplemental tables: 2

Sources of financial support:

- Agence National de la Recherche (ANR #19-CE21-0003-01, Recipient GW)
- Fondation Francophone pour la Recherche sur le Diabète (Recipient GW)
- Avignon Université (Recipient GW)
- Conseil Regional Provence-Alpes-Côte d'Azur (Recipient SR)

No conflict of interest was declared.

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to investigate the effects of a popular artificial sweetener (AS), sucralose, on body composition, glucose homeostasis, and vascular function in mice with standard or high fat diet.

Methods and results: C57BL6/J mice followed a 12-weeks normal chow (NC) or high fat (HF) diet supplemented with water sweetened or not with sucrose (10%) or sucralose (Su) solution, the latter corresponding to an intake of 15 mg.kg⁻¹.day⁻¹ (acceptable daily intake). Body composition, glucose control, blood pressure and ex-vivo vascular function has been evaluated. Interestingly, sucralose consumption had no effect on body composition in NC fed mice, but was accompanied by a lower insulin sensitivity, compared to other controls groups. In HF groups, sucralose rather than water or sucrose was able to prevent respectively 34.0% and 35.1% of the body mass increase and subsequent visceral adipocytes size increases. These results could be explain by a lower caloric intake or a lower lipid absorption in this group. Notably, HF-Su diet significantly restore glucose control and insulin sensitivity compared to HF diets. Finally, in HF fed mice, sucralose also prevented the alteration of vasodilatory function observed in other groups, with no systemic consequences on blood pressure.

Conclusion: Taken together, these results suggest that sucralose consumption within the acceptable daily intake consumption range was able to prevent deleterious effect of a HF diet on body composition and glucose homeostasis. These metabolic responses could explain, at least in part, the vascular impact of sucralose consumption observed in HF-induced obese mice.

Keywords: *sucralose; artificial sweeteners; glucose homeostasis; vascular function; cardiovascular risk*

INTRODUCTION

Sugar intake count toward the main associated factors contributing to the worldwide epidemic of obesity and diabetes (Pereira et al., 2014). It also participate to the increase incidence of cardiovascular diseases, accounting for approximately 31% of the overall global mortality rate each year and being the leading cause of death among obese and diabetic population (Nwaneri et al., 2013; WHO, 2017). As an alternative to replace high-energy added sugars, low calorie sweeteners have been increasingly used in food and beverages. By providing consumers with products that have a sweet taste and low-energy content, AS appear to be an efficient tool to enhance weight loss and reduce cardiometabolic diseases. But, despite these promising effects, there is still a strong very topical debate questioning their physiological inactivity (Ahmad et al., 2019; Pepino, 2018).

Several epidemiological studies have raised the alarm, highlighting that high consumers (>2 beverages/day) of AS within the general population are still at risk of developing T2D, heart disease and death from circulatory diseases (Malik et al., 2019; Azad et al., 2017; Fagherazzi et al., 2017; Mullee et al., 2019; Mossavar-Rahmani et al., 2019). Interestingly, high consumption of AS also shows increased risk of cardiovascular mortality and stroke, among participants with, either BMI $\geq$ 25 or $\geq$ 30 kg/m² (Fakhouri et al., 2012; Malik et al., 2019). This result is particularly important since AS are typically consumed by individuals already suffering from obesity or cardiometabolic conditions. Moreover, recent studies in animals and humans challenge previous claims submitted to regulatory agencies, describing AS as stable compounds that are not metabolized in vivo, with no effect on glucose metabolism (Lertrit et al., 2018; Romo-romo et al., 2018; Bornemann et al., 2018). Beyond these glucose control alteration, we also recently demonstrated the detrimental effects of a sucralose and acesulfame potassium cocktail consumption on vascular function (Risdon et al., 2019). As impairments in vascular reactivity promote atherosclerotic change and is also a key contributor to the onset and progression of the diabetes vascular complications, further experimental studies are needed to understand the underlying mechanisms (Gokce et al., 2003; Heitzer et al., 2001). Furthermore, impaired vascular reactivity may also contribute to the development of obesity and insulin resistance. Therefore, vascular function monitoring could be a good marker to study health issues related to metabolic changes that may be associated with AS consumption.

In this context, this work was conducted to evaluate the individual effect of sucralose on the development of metabolic or cardiovascular alterations. Sucralose is the most commonly used artificial sweetener worldwide, accounting for 62% of the global LCS market and still in constant increase in

food and beverages these last years according to the Observatory of food quality (Wang et al., 2018; *Observatoire de la Qualité de l'Alimentation*, OQALI, 2019). It has been recommended that individuals should limit sucralose consumption to no more than 15 mg/kg/day (Acceptable Daily Intake, ADI), without specific advice for vulnerable groups (e.g. pregnant women or people with obesity or type 2 diabetes) (Mortensen, 2006).

Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of chronic sucralose consumption, at the ADI level, in mice following a standard or an obesogenic diet. The evolution of the body composition, the total caloric intake, the adipose tissue status as well as the glucose and insulin regulation were assessed, giving a global insight of sucralose effects on metabolism that could influence the cardiovascular risk. Then, in order to assess directly its implication in cardiovascular impairment, we investigate the effect of this sucralose-supplemented diet on vascular function as an early marker for cardiovascular disease development.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Two independent set of animal have been used for this study. Both included male C57BL/6J mice aged 10-11 weeks that were obtained from Janvier Laboratories (Saint-Berthevin Cedex, France). Animals were housed in individual cages and maintained at a controlled room temperature with 12-h light-dark cycles and free access to water and food (N° CEEA00322.03, EA4278, LaPEC). All investigations conformed to the European Parliament Directive 2010/63/EU and were approved by the local ethics committee of Marseille (N° 2020050612125728).

Experimental protocol

Both experimental designs included mice that were randomized into six groups (n = 15 per group); three groups were fed with a control diet (normal chow, NC) (A04, SAFE, France) or a high-fat diet (HF) (230-HF 60%, SAFE, France). Both normal chow and high fat diets were associated with either water (W) (NC-W and HF-W respectively), Water supplemented with 10% Sucrose (S, Sucrose-S8501 Sigma-Aldrich) (NC-S and HF-S respectively) or 0.017% sucralose (Su, Sucralose-69293 Sigma-Aldrich) (NC-Su and HF-Su respectively). Mice were fed with these diets during 12 weeks for the first set of mice and 5 weeks for the second.

At the 12th week of the protocol, the first set of mice underwent oral glucose tolerance test (OGTT) or insulin tolerance test (ITT), and blood pressure measurement. At the end of study, the mice were anesthetized with an intra-peritoneal injection of Dolethal (Vétoquinol, 182.2mg pentobarbital/kg of b.w.). Subcutaneous, inguinal, peri-nephric, epididymal white adipose tissue and interscapular brown adipose tissue were weighted and split to either be fixed in Formaldehyde (10%) for further histological analyses or be frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for biochemical assays.

For the second set of mice, feces were collected after the second week of diet for fecal lipid quantification. Then, mice were individually housed in a cage with a free access to a running wheel, in order to assess the effect of sucralose consumption on spontaneous physical activity. Once experiments were completed, animal were sacrificed by cervical dislocation.

Biochemical measurments

Quantification of Insulin was performed using Mercodia Mouse Insulin ELISA kit (10-1247-01, Mercodia).

Fasting blood glucose, glucose and insulin tolerance test

Oral Glucose Tolerance Tests (OGTT) were performed at the end of the 12th week of the protocol on

half of the mice (i.e. 8 mice per group). After an overnight fasting, blood was obtained via tail clip to assess fasting blood glucose (Caresens® N, DinnoSanteTM). Then, mice were gavaged with a glucose solution (1.5g/kg), and blood glucose was measured at 10, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes after the glucose gavage. During the same week, the other half of the group (n=7 per group) undergoes an insulin tolerance test. First, six hours fasting blood glucose was measured. Then, mice received an intraperitoneal injection of insulin solution (1UI/kg) and blood glucose was measured at 10, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 minutes after the insulin injection.

Adipocyte histological analyses

Adipose tissue sections 10 µm thick were stained with hematoxylin and eosin. A morphological analysis was performed using a Leica microscope (Leica MR2125RTS). Adipocyte size measurement was performed using Adipocyte_Tools.ijm (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, USA).

Preparation of isolated thoracic aortic rings and vascular reactivity

After mice were anesthetized, thoracic aorta was quickly removed and placed in cold Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (KH, composition in mM: 118 NaCl; 5.3 KCl; 2.5 MgSO₄; 1.2 KH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 11 Glucose; 1.7 CaCl₂). After the removal of PVAT, the aorta was cut into 3 mm thick. The obtained aortic rings were mounted into stainless steel supports and suspended in the tissue bath containing Krebs Henseleit buffer at 37°C continuously bubbled with O₂-CO₂ gas mixture (95%-5%). The rings were connected to an isometric force transducer (EMKA technologies, EMKA Paris, France), and linked to an amplifier (EMKA technologies, EMKA Paris, France), and a computer acquisition system using IOX (EMKA Technologies) to record changes in isometric force. After equilibration for 60 minutes at an initial tension of 0.8g, rings were precontracted with 125mM KCl to test the viability of smooth muscle cells. Then, the integrity of endothelium was assessed by acetylcholine (ACh, 10µM) on phenylephrine pre-contracted (PE, 1µM) vessels. To include the data, a minimal relaxation of 60% (of PE contraction) was required during this integrity test. Once aortic ring integrity was confirmed the vasorelaxant capacities of vascular endothelium have been evaluated using a dose-response test to ACh concentration (1.10⁻⁹M to 3.10⁻⁵M) on PE-precontracted (10⁻⁶M) aortic rings. At the end of the dose response, SNP (10⁻⁴M) was injected in the organ bath to assess the maximal relaxation of vascular smooth muscle cells.

Lipids absorption measurement

Total lipids were extracted from the feces following the method described by Folch et al. Samples are homogenized in a chloroform/methanol/HCL mix and centrifuged at 2000 RPM for ten minutes (4°C) to obtain two distinct phases in the tube (tube A). The inferior, chloroformed, phase is transferred to another tube (tube B), while the tube A is centrifuged again at 2000 RPM for ten minutes 4°C with an

additional volume of chloroform. The obtained chloroformed phase is added to the tube B. Finally, following the same protocol as previously described, tube B is centrifuged with additional 0.9% NaCl solution in order to remove all the eventual impurity contained in the sample. The chloroformed phase from tube B is transferred in a third tube and evaporated in a nitrogen atmosphere. Finally, the obtained dry-phase is weighted for the quantification of absorbed lipids.

Spontaneous physical activity

Voluntary exercise was evaluated after 2 weeks of diets. Mice had free access to an exercise wheel (1 mice/cage) (n=6 per group). Wheels were connected to a sensor for a daily record of the number of laps being executed in each cage. After 2 days of acclimatization, the animal running was recorded during twenty-four consecutive hours, once a week.

Statistical analyses

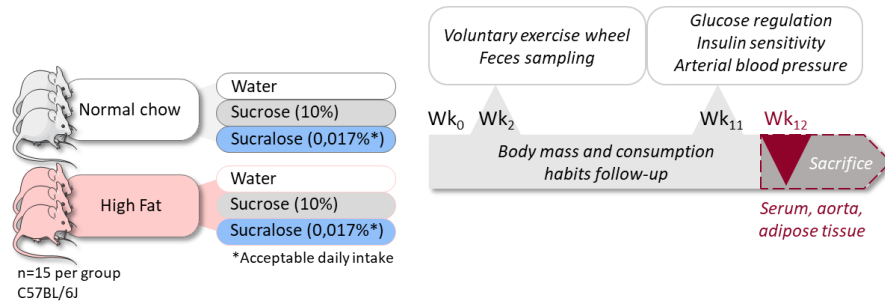
Data were expressed as the mean $\pm$ SEM. For comparison of experimental conditions, an analysis of variance (ANOVA) or repeated measures ANOVA followed by a Tukey's adjusted test were used. Repeated measured ANOVA were used to analyse oral glucose and insulin tolerance tests, as well as vascular endothelial-dependent relaxation values between groups. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant. Statistical analyses were done with GraphPad Prism version 8.0.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA). Outlier detection in each experiment has been performed using MedCalc® Statistical Software version 19.6 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium).

RESULTS

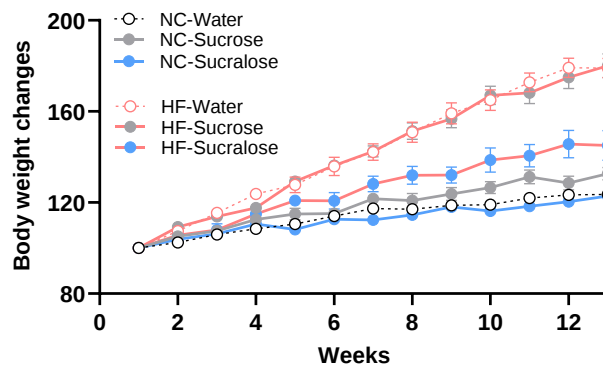
Chronic sucralose consumption limits adipogenecity in induced-obese mice

In order to evaluate the effects of our diet, we first evaluated their consequences on body composition, and fat tissues. After twelve weeks of dietary treatment with sweeteners (Fig. 1A), NC mice fed with sucrose have a higher weight than those fed with water or sucralose. The presence of high fat (HF) in the diet significantly increased body weight in our groups (Fig 1A). Interestingly, this increase in body weight with HF consumption was not observed in the sucralose-supplemented group which had a significantly lower body weight than HF-W (-34.0%) group and HF-S group (-35.1%) at the end of the protocole (Fig. 1B). In order to investigate the influence of these diets on body composition, adipose tissues were weighted and adipocytes size was evaluated. No effect of sucrose or sucralose supplementation was observed in normal chow groups. As expected, high fat diet consumption increase adipose tissues in HF-W and HF-S groups compared to normal chow ingestion. However, we can observe that after our 12 weeks diets sub-cutaneous, epididymal and brown adipose tissues were lower in HF-Su groups than in both other HF groups (Fig. 1C). Moreover, peri-renal fat was also significantly lower in HF-Su group than HF-W. This contributed to the lower adiposity index in the HF-Su group compared to HF-W (-26.6%) and HF-S (-25.4%) group (data not shown). These results were corroborated by the adipocytes size quantification. Indeed, epididymal white adipocytes size were significantly lower in HF-Su than in both other HF groups (Fig. 1D). Regarding the standard diet group, sucrose consumption was associated with a higher epididymal adipocyte size, which was not observed in sucralose group (Fig 1D). The alterations of body weight as well as the increase in epididymal adipocyte size observed in the standard diet groups may be explained by the different caloric intakes. Indeed, a higher caloric intake is observed in the NC-S group compared to both NC-W and NC-Su groups (Fig. 1E). This result appears to be the consequence of an increased consumption of the highly caloric drink (10%-sucrose) in HF-Su group (Supp. Fig. 2B). Regarding HF groups, it is important to note that HF-Su mice have a lower caloric intake than HF-W and HF-S mice (Fig. 1E). Interestingly, this result was associated with a significantly lower leptinemia in the HF group consuming sucralose when compared to HF-W and HF-S groups (Supp. Fig. 1).

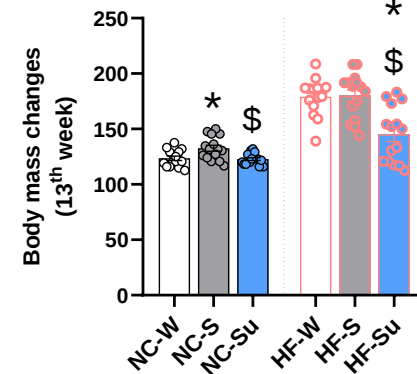
A



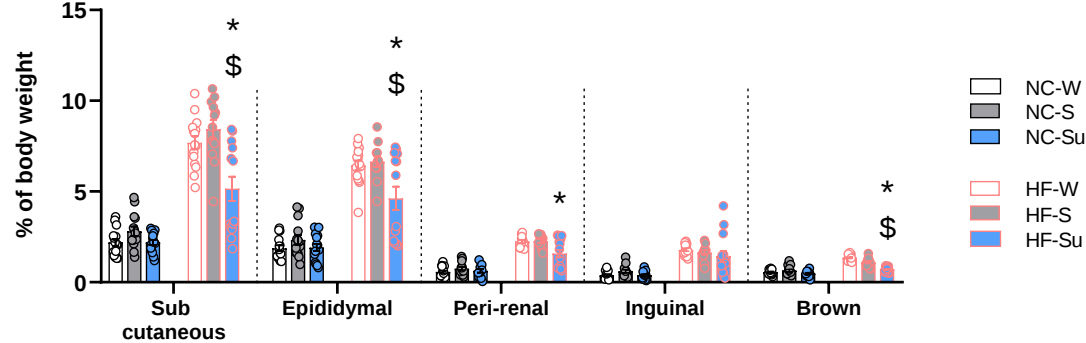
B



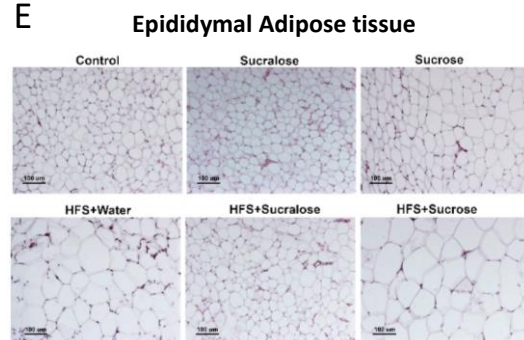
C



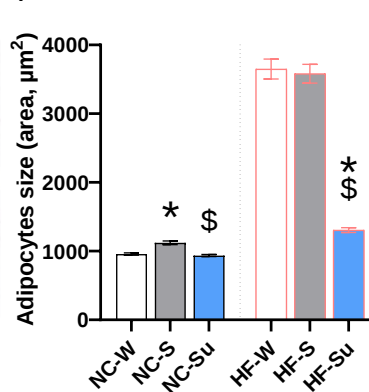
D



E



F



G

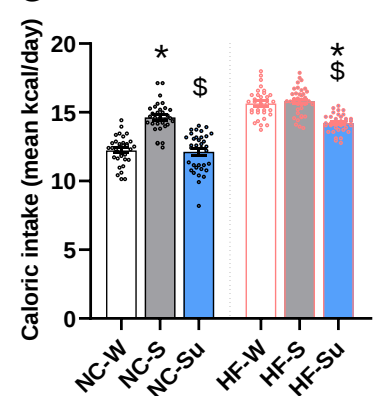


Figure 1. Experimental design and body composition characterization of mice fed with either water, sucrose or sucralose with and without high fat. Experimental design (A) Effects of diets on body mass (B) and body fat accumulation in sub-cutaneous, epididymal, perinephric, inguinal and brown adipose tissue (C). Epididymal adipocytes size evaluated on histological sections (D). Caloric intake during the 12-weeks diets (E). NC indicates Normal Chow, HF indicates High Fat Diet, W/S/Su indicates

Water/Sucrose/Sucralose. n=15 mice/group, n=5 mice/group for histological analyses. Data are expressed as mean $\pm$ SEM; *P<0.05 vs Water group, \$P<0.05 vs Sucrose group.

Chronic sucralose consumption limits adipogenicity in induced-obese mice

Beyond caloric intake, we have evaluated lipid absorption through the quantification of fecal lipid (Lee et al., 2008), and the energy expenditure between the different groups in order to understand our results regarding body composition. Surprisingly, lipids in feces appeared to be lower in NC-Sucralose group than in NC-W and NC-S groups. However, in HF groups, sucralose consumption was responsible for a lower lipid absorption since lipids in feces appeared to be higher than in HF-W group and tended to be higher than HF-S group (P=0.06) (Fig. 2A). These results suggest that chronic consumption of sucralose is associated with a lower absorption of lipids that probably participate to delay the adipose tissue accumulation in the context of a high fat diet. Otherwise, although mice fed with high fat diet were less active than the normal chow groups, no effect of the sweetener supplementations was reported within groups (Fig. 2B).

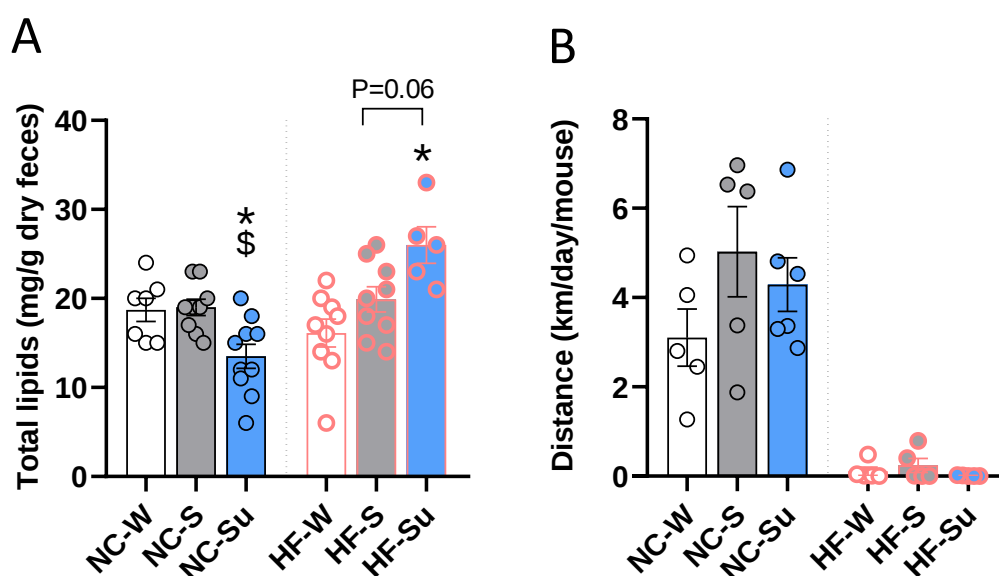


Figure 2. Effects of a sucrose or sucralose 12 weeks-diet on lipid absorption and spontaneous activity.

Measurement of lipids in feces used to assess lipid assimilation (A). Quantification of spontaneous physical activity in mice after two weeks of diet (B). n=6 mice/group for lipids feces assessment, n=5-6 mice/group for the spontaneous activity. NC indicates Normal Chow, HF indicates High Fat Diet, W/S/Su indicates Water/Sucrose/Sucralose. Data are expressed as mean $\pm$ SEM *P<0.05 vs Water group, \$P<0.05 vs Sucrose group

Preservation of insulin pathway in HF mice with chronic sucralose consumption

Disturbance in glucose metabolism can also participate to increase the cardiovascular risk, by promoting obesity and type 2 diabetes. Therefore, we assessed first the effects of our diets on blood glucose and insulin levels. No difference in fasting glycemia and insulin was observed in mice with a standard diet (Fig. 3A, B). Regarding HF diet, a lower blood glucose is reported in mice consuming sucralose when compared to both other groups (Fig 3A). This result was associated with a lower insulin in HF-Su mice when compared to HF-W (Fig 3B). Surprisingly, HF mice fed with sucrose had also a lower insulin than HF-W mice and no difference could be observed between HF-S and HF-Su groups. In order to understand these results we assessed the glucose regulation capacity in each group and evaluated insulin sensitivity, which is a major regulator of glucose metabolism.

Oral glucose tolerance test within the NC groups revealed that mice fed with sucralose had an increase in glucose regulation as observed with the area under the curve (AUC) (Fig. 3C). This result could not be explained by the insulin response since the result of the ITT pointed out a decreased insulin-sensitivity in mice fed with sucralose compared to both other groups (Fig. 3D). Regarding the HF groups, no significant results were observed during the OGTT (Fig. 3E). It is interesting to note that the decreased insulin concentrations observed in HF-S and HF-Su were associated with a higher insulin sensitivity as observed during the insulin tolerance test (Fig. 3F). In another hand, the results obtained in the HF group are consistent with the previous results reported in the same group on body composition. Sucralose consumption not only delay adipose tissue accumulation but also prevent the alteration of insulin pathway, which was characterized by a higher insulin sensitivity and lower fasting insulin concentration.

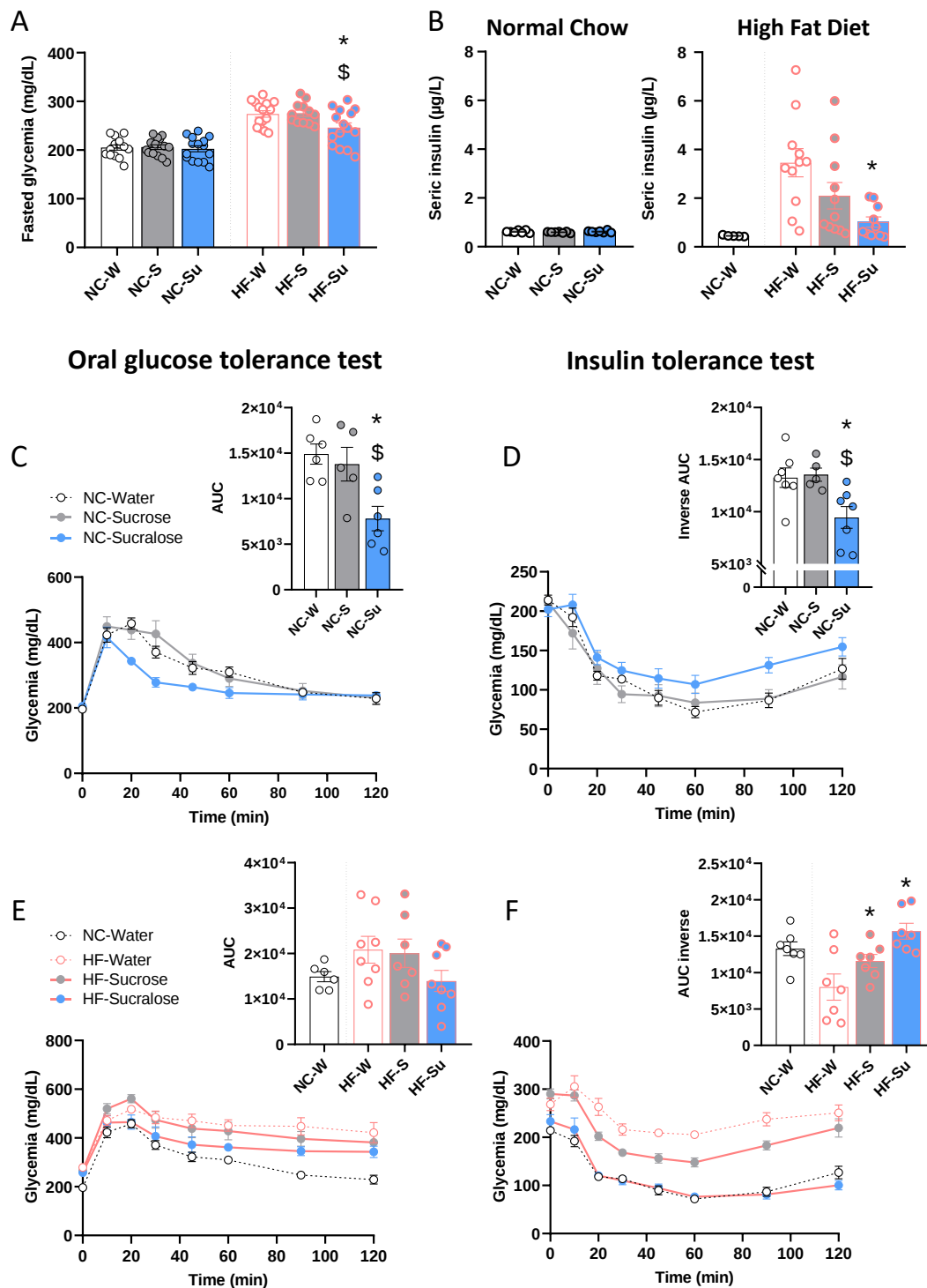


Figure 3. Assessment of the metabolic response to oral glucose and intraperitoneal insulin tolerance tests of mice fed with sucrose or sucralose with and without high fat during twelve weeks. Overnight fasting glycemia (A) and serum insulin (B) evaluated at the end of the twelve weeks protocol. Oral glucose (C, E) or insulin (D, F) tolerance test of the different group of mice fed with normal chow (C, D) or High Fat diet (E, F) and their corresponding area under curve analyses. NC indicates Normal Chow, HF indicates High Fat Diet, W/S/Su indicates Water/Sucrose/Sucralose. n=6-8 mice/group. Data are expressed as mean $\pm$ SEM *P<0.05 vs Water group, \$P<0.05 vs Sucrose group. AUC indicates Area Under Curve.

Alterations of vascular function in response to sucralose consumption

Metabolic changes induced by the experimental diet can potentially affect the vascular function and integrity. After twelve weeks of diet, no effect of our diets was observed on blood pressure. Indeed, no difference was observed regarding diastolic and systolic blood pressure, whatever the diet in NC or HF groups (Fig. 4A, B). Nonetheless, the regulation of blood pressure is a complex interplay between numerous factors and compensatory mechanisms can occur to counterbalance potential impairments. Therefore, in addition to blood pressure measurement, we choose to investigate the vascular endothelial function, which is an early marker of cardiovascular dysfunction.

As vascular tone is determined by the balance of competing vasoconstrictor and vasodilator influences, we first investigated the vascular response to a α 1-adrenergic agonist to assess vasoconstriction capacity. No significant change in constriction strength was observed between groups, whatever the diet, in response to phenylephrine (Fig. 4C, D). We also evaluated endothelial vasorelaxation properties to endothelium dependent (ACh) and endothelium-independent (SNP) vasodilators. No change was observed between groups in response to SNP pointing out the lack of effect of either sucrose or sucralose in NC and HF diet on smooth muscle cell function (data not shown). Moreover, no effect of sucrose was observed in standard (Fig. 4E) and HF (Fig. 4F) diets in response to ACh. Nevertheless, sucralose consumption along with standard and HF diet was able to enhance aortic relaxation to ACh (Fig. 4E, F). All together, these results strengthen the unarming effects of sucralose on both standard diet and HF diet groups on vascular parameters.

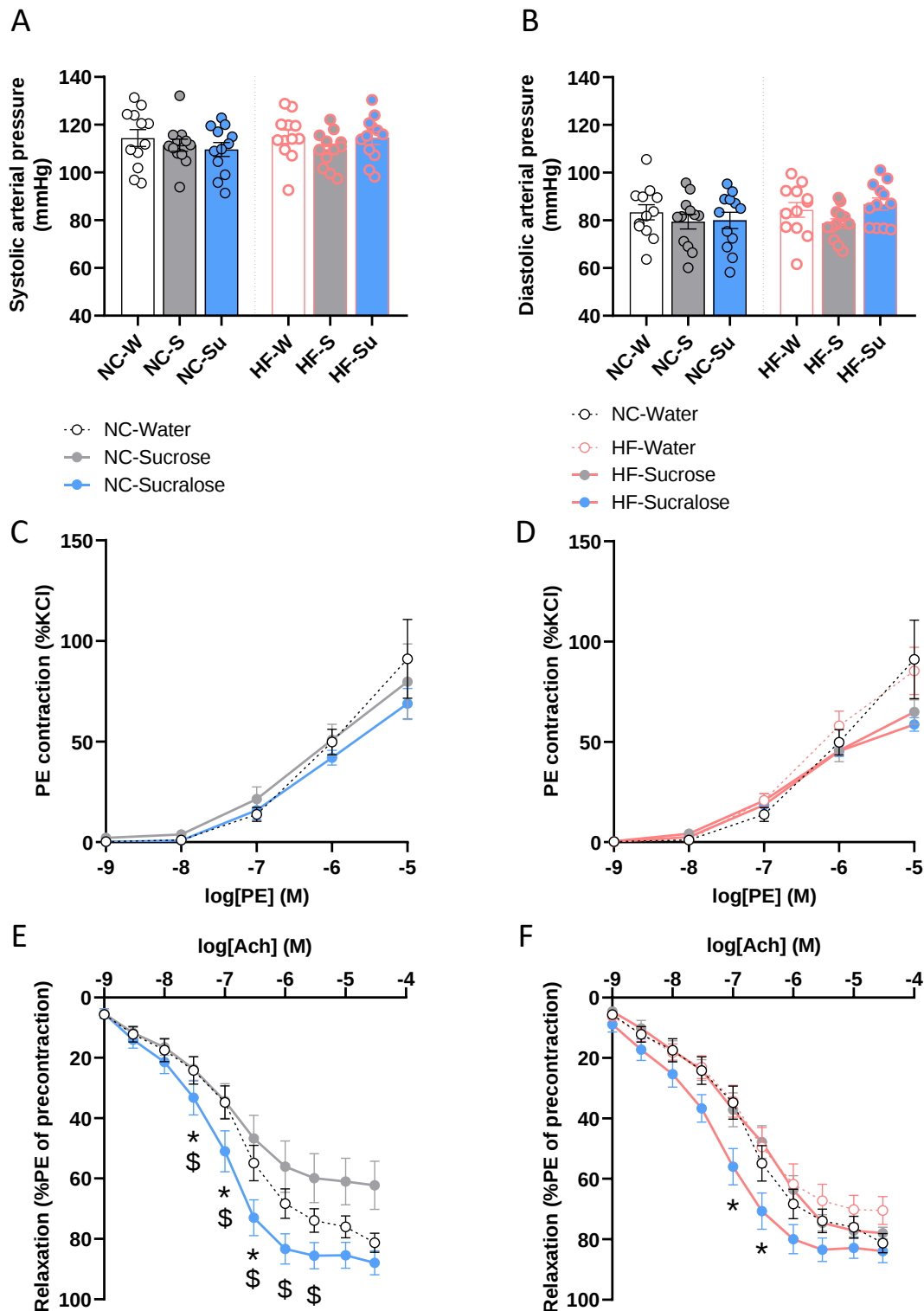


Figure 4. Arterial blood pressure and vascular function of mice fed with sucrose or sucralose with and without high fat during twelve weeks. Systolic (E) and diastolic (F) arterial blood pressure during the 12th week of diet. Adrenergic response of aortic rings using dose-response to PE in standard diet (D) or HF diet (C) groups. Dose-response to ACh in precontracted aortic rings in NC (E) or HF (F) diets. NC indicates Normal Chow, HF indicates High Fat Diet, W/S/Su indicates Water/Sucrose/Sucralose. Data are expressed as mean $\pm$ SEM * P <0.05 vs Water group, \$ P <0.05 vs Sucrose group.

DISCUSSION

Despite widespread usage, the impact of AS consumption on cardiometabolic health remains unclear and controversial. This situation is notably due to the recent emergence of epidemiological alerts and a lack of interventional data testing for causality. To our knowledge, this study is the first to address both the metabolic and cardiovascular consequences of chronic sucralose ingestion, the most consumed AS worldwide. In summary, the experimental data presented here suggest that persistent sucralose consumption has a favorable impact on the development of adiposity, metabolism and vascular function in context of hypercaloric regimen while its overall effect appeared to be rather detrimental in context of normocaloric regimen.

Sucralose consumption prevent body composition changes in high-fat diet: importance of the dose

Controversies are still existing whether AS are a good strategy for body weight management. Interestingly, the use of sucralose along with a HF diet has drastic effect to limit body weight increase and visceral adipose tissue accumulation. These findings are consistent with recent data in rats fed with HF diet, demonstrating that sucralose within beverage during 4 months, also highly reduced body mass (Sánchez-Tapia et al., 2019). Furthermore, a very recent randomized controlled study in patients with obesity consuming 1.25 to 1.75L of beverage, each day for 12 weeks, demonstrated that the replacement of sucrose with 0.16g of sucralose, but not with other AS (e.g. saccharine, aspartame, Rebaudioside A), was able to prevent a 1.51 kg body mass increase (Higgins and mattes, 2019). Modulation of body weight is the consequence of an imbalance between energy intakes and energy expenditure. AS are molecules as sweet as natural sugars but their caloric content and metabolism routes are different (Roberts et al., 2000; Magnuson et al., 2016). Consequently, it seemed interesting to evaluate if sucralose consumption is able to modulate caloric intake and energy expenditure. We reported here that the sucrose and the sucralose group ate less food than the control. However, since the sucrose group was the only one that had a caloric beverage (Supp. Fig. 2A, B), mice fed with sucralose were found to have the lowest caloric intake across HF groups. Even if not confirmed in all studies, a previous work reported that sucralose consumption can be associated with a lower caloric intake (Raben et al., 2002) that might be due to the upregulation of satiety hormones such as GIP and GLP-1 (Jang et al., 2007). Regarding energy expenditure, although we reported a global negative effect of HF diet on spontaneous activity, no specific effect of sucralose consumption was observed in mice drinking sucralose along with the HF diet.

We know that changes in food intake as well as body mass can be associated with an alteration of adipose tissue. This tissue is particularly interesting while studying sucralose since it has been previously reported that its sequestration in adipose tissue was increased after a 40 weeks sucralose diet that respected the ADI recommendation (Bornemann et al., 2018). Thus, we evaluated the effect of sucralose consumption on adipocytes size and adipose tissues' weight. Both parameters pointed out that sucralose consumption was able to prevent HF diet-induced adipogenesis. Our results also demonstrated that lipid absorption was reduced in HF-Su group compared to other HF groups, suggesting consequently a lower lipid storage in adipose tissue. These results are interesting, since *in vitro* stimulation of adipocytes with sucralose showed contradictory results regarding the ability of the different AS to impact adipogenesis and lipolysis (Masabuchi et al., 2013; Sen et al., 2015). Nevertheless, reduced adipogenesis and increased lipolysis were reported when adipocytes or 3T3-L1 cells were stimulated with sucralose, mainly by activation of adenylate cyclase c-AMP signaling pathway. *In vivo* studies are therefore needed to investigate the role of sucralose on adipogenesis and lipolysis mechanism to better understand the results of the present study.

More specifically, our study is also highlighting the need to take into consideration the dosage of sucralose consumption used in experimental and clinical studies. In this context, we observed that using the sucralose ADI-dosage during 12 weeks has no effect on mice body mass and composition in a standard diet. In addition, the measurement of adipocytes size in visceral epididymal adipose tissue in these mice did not show any difference with all other NC groups, while another study in rats showed an increase in body mass and adipocytes size by using sucralose at a concentration exceeding 100 times approximatively the ADI (Sánchez-Tapia et al., 2019). The increased lipid droplet size in visceral adipose tissue in their model was explained by a strong stimulation of lipogenesis via SERBP-1 expression (Sánchez-Tapia et al., 2019). Taken altogether, these findings suggest that sucralose consumption in the ADI range may have neutral or beneficial effects on long-term body weight control.

Sucralose chronic consumption prevents glycemic control disruptions induced by high fat diet

Beyond affecting body weight control, AS are also suspected to affect glycemic control, especially since glucose absorption may be reduced upon replacement of available carbohydrates. In the present study, when mice were fed with a diet poor in fat content, and sucralose beverage, we observed a slight decrease in insulin sensitivity and an increased glucose regulation in response to an oral glucose tolerance test compared to water and sucrose. This is consistent with previous studies, which demonstrated no effect on insulin sensitivity after acute and short-term sucralose consumption alone, whereas sucralose-sweetened beverages, containing carbohydrates, or sucralose ingested before a

glucose load, decreased insulin sensitivity, in healthy individuals or patients with obesity (Romo-Romo et al., 2018; Lertrit et al., 2018; Pepino et al., 2013; Dalenberg et al., 2020). Others also described an association between 4 months or 2 weeks of sucralose consumption respectively and hyperinsulinemia incidence in a fasting state (Sánchez-Tapia et al., 2019; Lertrit et al., 2018). Therefore, it has been suggested, that sucralose as well as other sweeteners may impair glucose metabolism only when absorbed with a glucose load or a meal containing carbohydrates (Risdon et al., 2018; Suez et al., 2014; Philippaert et al., 2017). Indeed, Philippaert et al. observed similar response with steviol glycosides, sweeteners that are found in stevia plant (Philippaert et al., 2017). In this study, they showed that stevioside has potent effect to reduce glucose intolerance in mice, and that the molecular mechanism of these effects were the increase of TRPM5 channel activity in pancreatic beta cells, independently of sweet taste receptors. However, they also reported the potent therapeutic effect of this natural sweetener for the prevention and treatment of metabolic disease. Considering the epidemiological development of obesity and type 2 diabetes and the associated financial burden, there is an urgent need for development of nutritional approaches for this condition. Our data showed that sucralose consumption in a context of HF-induced obesity was associated with a preserved glycemic control (fasted glycemia and response to glucose tolerance test) compared to their counterpart fed with HF and drinking water or sucrose. Moreover, insulin sensitivity was also significantly higher after sucralose consumption, which was in coherence with a lower fasted insulin rate in this group. Nevertheless, whether the signaling pathway implicating TRPM5 channel is common to every sweetener and especially sucralose remains to be determined.

Here, we also demonstrated the potential of sucralose to prevent the metabolic alterations induced by a high fat diet with or without sucrose consumption. It is important to notice that in obese patients with no previous exposure to any AS, sucralose consumption exacerbated the glycemic response and the insulin secretion after a hyperglycemic stress compared to their control (Pepino et al., 2013). This emphasize the importance of the experimental design model, as the beneficial effects of sucralose on glucose regulation could be dependent of the metabolic status of the individuals. Moreover, whether sucralose affects glucose homeostasis through secretion of other hormones, such as incretins, or through alteration in gut microbiota still need to be clarified.

Sucralose chronic consumption prevents cardiometabolic alterations induced by high fat diet

Previously, it has been reported that overweight or obese individuals are more likely to develop circulatory disease when they are regular AS consumers. Moreover, we demonstrated for the first time, in our previous study, that a sucralose and acesulfame potassium combination in drinking water

at an ADI-dosage was able to decrease the arterial vasomotricity in rat eating a normal chow. This impairment was only unveiled in response to an acute hyperglycemic stress (Risdon et al., 2020). Thus, one of the objective of this present study was to investigate the effect of a chronic alteration in glycemic control on the vasomotor function, a well-known sensitive marker of cardiovascular disease. However, in the present model, along with a better glucose regulation described above, sucralose alone did not decrease vascular function. Our results even show that replacing sucrose by sucralose may prevent hyperglycemic-dependent vascular dysfunction when mice were fed with NC diet. Moreover, a mild but significative potentiation of the vasorelaxation capacity was observed in this group, and more interestingly also in HF group. Since these effects are observed in both diets, the indirect effect of a “better management” of risks factor such as adipose tissue accumulation and glycemic control, may not be the only reason to understand these results. Indeed, our data are questioning again the specific biological action of each AS molecule, as previously discussed (Pang et al., 2021). Most of sucralose, upon administration of a normal ADI-dosage, passes through the gastrointestinal tract entirely to be eliminated in the feces, whereas only a small amount (approx. 20%) is absorbed (Sylvetsky et al., 2017; Roberts et al., 2000). Nevertheless, previous studies demonstrated that acute sucralose incubation is still able to activate sweet taste receptors in retinal and pulmonary endothelial cells to induce mechanisms such as permeability, proliferation or migration of endothelial cells (Harrington et al., 2018; Lizunkova et al., 2018). Overall, in our model, even at a low dosage, the addition of sucralose in mice fed with a high fat diet, has been able to increase the vasodilation capacity. This effect could preserve vascular endothelial integrity in a HF-induced obesity model, and maybe participate to decrease long-term cardiovascular risk in those populations. Yet, human evidence of this indirect or direct effect of sucralose on vascular function is lacking and whether these effects are specific only to sucralose remain to be explored.

The major limitation in this work was the absence of marked vascular dysfunction in mice fed with HF or HF with sucrose, as previously described in the literature (Dou et al., 2014; Meziat et al., 2019; Battault et al., 2017). Consequently, further studies including an acute stressful condition such as a hyperglycemic stress would be necessary in order to eventually unveil a potential impairment that was kept hidden in this work. Moreover, it would be interesting to evaluate the influence of sucralose consumption on both inflammation and oxidative stress status which are highly recognized to alter vascular function and were not assessed here (Kobayasi et al., 2010). Finally, there is also a need for further research to understand if these observations on vascular function are clinically relevant, as we did not demonstrate any effect of sucralose on systemic blood pressure after 12 weeks.

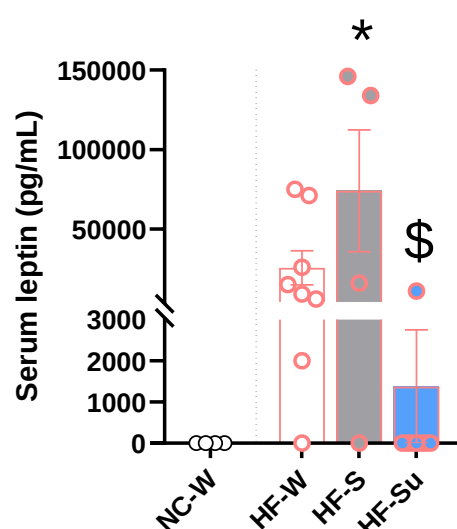
CONCLUSION

AS have been progressively introduced in the everyday diet with the intention to reduce caloric intake but also to normalize blood glucose levels, thus limiting the deleterious effects on human health of our modern diets. Previous findings in human and animal models suggested that these AS may have directly contributed to enhancing the risk to become obese, diabetic and associated to a higher cardiovascular mortality among frequent users. However, the present study is the first to look specifically at the effects of a chronic ingestion of sucralose on vascular function at a physiological concentration. Surprisingly, our results did not confirm the main hypothesis, which was that a mid-term sucralose consumption would have deleterious effects on arterial vasomotricity. Our data even highlighted the potential preventive (or delaying) effect of sucralose on cardiovascular risk in a context of obesogenic diet, putting back in the center the question of specific effect of distinct AS, and the need to conduct realistic experimental studies in respect of the maximal dose authorized in humans.

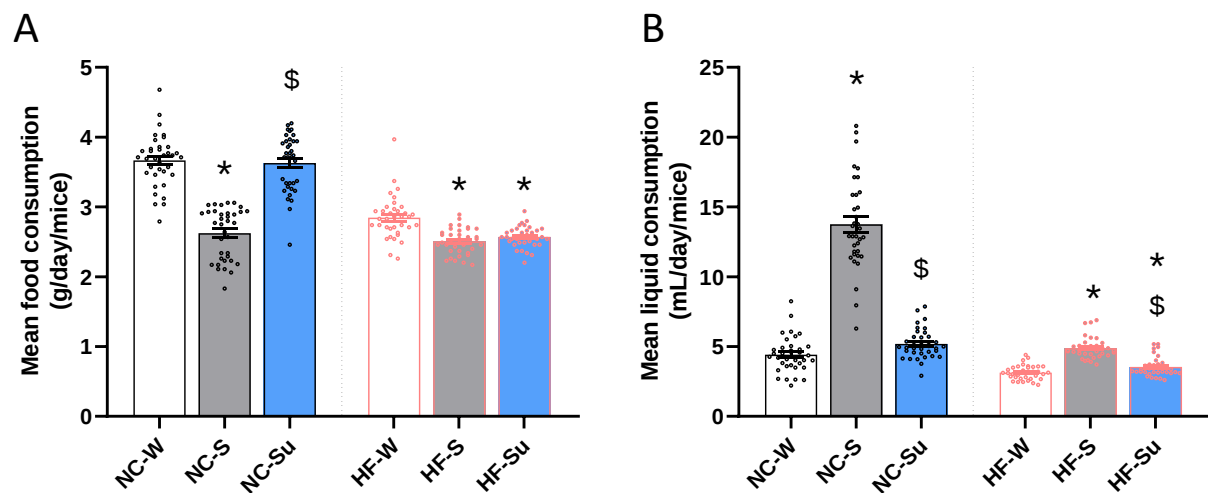
SUPPLEMENTAL MATERIAL

Methodology and results

A follow-up of food and liquid consumption Serum leptin rate was determined using commercial ELISA kits (ab199082 – Leptin Mouse SimpleStep ELISA® Kit).



Supplemental figure 1. Serum leptin concentration after twelve weeks of sucrose or sucralose consumption with or without high fat diet. NC indicates normal chow, HF indicates high fat diet, W indicates water, S indicates sucrose, Su indicates sucralose. n=4-8 mice/group. * : $P < 0.05$ vs HF-W, \$: $P < 0.05$ vs HF-S.



Supplemental figure 2. Food and liquid intake of mice fed with sucrose or sucralose with and without high fat during twelve weeks. Food (A) and liquid (B) total intake during twelve weeks of diet. n=15 mice/group. * : $P < 0.05$ vs Water group, \$: $P < 0.05$ vs Sucrose group.

REFERENCES

Ahmad, S.Y., Azad, M.B., Friel, J., and MacKay, D. (2019). Recent evidence for the effects of nonnutritive sweeteners on glycaemic control. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*.

Azad, M.B., Abou-Setta, A.M., Chauhan, B.F., Rabbani, R., Lys, J., Copstein, L., Mann, A., Jeyaraman, M.M., Reid, A.E., Fiander, M., et al. (2017). Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Can. Med. Assoc. J.* **189**, E929–E939.

Battault, S., Meziat, C., Nascimento, A., Braud, L., Gayraud, S., Legros, C., De Nardi, F., Draï, J., Cazorla, O., Thireau, J., et al. (2017). Vascular endothelial function masks increased sympathetic vasopressor activity in rats with metabolic syndrome. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **314**, H497–H507.

Bornemann, V., Werness, S.C., Buslinger, L., and Schiffman, S.S. (2018). Intestinal Metabolism and Bioaccumulation of Sucralose In Adipose Tissue In The Rat. *J. Toxicol. Environ. Health A* **81**, 913–923.

Dalenberg, J.R., Patel, B.P., Denis, R., Veldhuizen, M.G., Nakamura, Y., Vinke, P.C., Luquet, S., and Small, D.M. (2020). Short-Term Consumption of Sucralose with, but Not without, Carbohydrate Impairs Neural and Metabolic Sensitivity to Sugar in Humans. *Cell Metab.* **31**, 493–502.e7.

Dou, J., Li, H., Ma, X., Zhang, M., Fang, Q., Nie, M., Bao, Y., and Jia, W. (2014). Osteocalcin attenuates high fat diet-induced impairment of endothelium-dependent relaxation through Akt/eNOS-dependent pathway. *Cardiovasc. Diabetol.* **13**, 74.

Fagherazzi, G., Gusto, G., Affret, A., Mancini, F.R., Dow, C., Balkau, B., Clavel-Chapelon, F., Bonnet, F., and Boutron-Ruault, M.-C. (2017). Chronic Consumption of Artificial Sweetener in Packets or Tablets and Type 2 Diabetes Risk: Evidence from the E3N-European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Ann. Nutr. Metab.* **70**, 51–58.

Fakhouri, T., Kit, B., and Ogden, C. (2012). Consumption of diet drinks in the United States, 2009–2010.

Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.

Gokce, N., Keaney, J.F., Hunter, L.M., Watkins, M.T., Nedeljkovic, Z.S., Menzoian, J.O., and Vita, J.A. (2003). Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 1769–1775.

Harrington, E.O., Vang, A., Braza, J., Shil, A., and Chichger, H. (2018). Activation of the sweet taste receptor, T1R3, by the artificial sweetener sucralose regulates the pulmonary endothelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **314**, L165–L176.

Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T., and Münzel, T. (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **104**, 2673–2678.

Higgins, K.A., and Mattes, R.D. (2019). A randomized controlled trial contrasting the effects of 4 low-calorie sweeteners and sucrose on body weight in adults with overweight or obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **109**, 1288–1301.

Jang, H.-J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M.J., Carlson, O.D., Kim, B.-J., Zhou, J., Kim, H.H., Xu, X., Chan, S.L., Juhaszova, M., et al. (2007). Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15069–15074.

Kobayasi, R., Akamine, E.H., Davel, A.P., Rodrigues, M.A., Carvalho, C.R., and Rossoni, L.V. (2010). Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J. Hypertens.* *28*, 2111–2119.

Lee, Y.-S., Kang, E.-Y., Park, M.-N., Choi, Y.-Y., Jeon, J.-W., and Yun, S.-S. (2008). Effects of sn-2 palmitic acid-fortified vegetable oil and fructooligosaccharide on calcium metabolism in growing rats fed casein based diet. *Nutr. Res. Pract.* *2*, 3–7.

Lertrit, A., Srimachai, S., Saetung, S., Chanprasertyothin, S., Chailurkit, L.-O., Areevut, C., Katekao, P., Ongphiphadhanakul, B., and Sriphrapadang, C. (2018). Effects of sucralose on insulin and glucagon-like peptide-1 secretion in healthy subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* *55–56*, 125–130.

Lizunkova, P., Enuwosa, E., and Chichger, H. (2018). Activation of the sweet taste receptor T1R3 by sucralose attenuates VEGF-induced vasculogenesis in a cell model of the retinal microvascular endothelium. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*

Magnuson, B.A., Carakostas, M.C., Moore, N.H., Poulos, S.P., and Renwick, A.G. (2016). Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutr. Rev.* *74*, 670–689.

Malik, V.S., Li, Y., Pan, A., De Koning, L., Schernhammer, E., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2019). Long-Term Consumption of Sugar-Sweetened and Artificially Sweetened Beverages and Risk of Mortality in US Adults. *Circulation* *2113–2125*.

Masubuchi, Y., Nakagawa, Y., Ma, J., Sasaki, T., Kitamura, T., Yamamoto, Y., Kurose, H., Kojima, I., and Shibata, H. (2013). A Novel Regulatory Function of Sweet Taste-Sensing Receptor in Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Cells. *PLoS ONE* *8*.

Meziat, C., Boulghobra, D., Strock, E., Battault, S., Bornard, I., Walther, G., and Reboul, C. (2019). Exercise training restores eNOS activation in the perivascular adipose tissue of obese rats: Impact on vascular function. *Nitric Oxide Biol. Chem.* *86*, 63–67.

Mortensen, A. (2006). Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects. *Scand. J. Food Nutr.* *50*, 104–116.

Mossavar-Rahmani Yasmin, Kamensky Victor, Manson JoAnn E., Silver Brian, Rapp Stephen R., Haring Bernhard, Beresford Shirley A.A., Snetselaar Linda, and Wassertheil-Smoller Sylvia (2019). Artificially Sweetened Beverages and Stroke, Coronary Heart Disease, and All-Cause Mortality in the Women's Health Initiative. *Stroke* *50*, 555–562.

Mullee, A., Romaguera, D., Pearson-Stuttard, J., Viallon, V., Stepien, M., Freisling, H., Fagherazzi, G., Mancini, F.R., Boutron-Ruault, M.-C., Kühn, T., et al. (2019). Association Between Soft Drink Consumption and Mortality in 10 European Countries. *JAMA Intern. Med.* *179*, 1479–1490.

Nwaneri, C., Cooper, H., and Bowen-Jones, D. (2013). Mortality in type 2 diabetes mellitus: magnitude of the evidence from a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Diabetes Vasc. Dis.* *13*, 192–207.

OQALI (2019). OQALI - Observatoire de la Qualité de l'Alimentation - Additifs.

Pang, M.D., Goossens, G.H., and Blaak, E.E. (2021). The Impact of Artificial Sweeteners on Body Weight Control and Glucose Homeostasis. *Front. Nutr.* 7.

Pepino, M.Y. (2018). The not-so-sweet effects of sucralose on blood sugar control. *Am. J. Clin. Nutr.* 108, 431–432.

Pepino, M.Y., Tiemann, C.D., Patterson, B.W., Wice, B.M., and Klein, S. (2013a). Sucralose Affects Glycemic and Hormonal Responses to an Oral Glucose Load. *Diabetes Care* 36, 2530–2535.

Pepino, M.Y., Tiemann, C.D., Patterson, B.W., Wice, B.M., and Klein, S. (2013b). Sucralose Affects Glycemic and Hormonal Responses to an Oral Glucose Load. *Diabetes Care* 36, 2530–2535.

Pereira, M.A. (2014). Sugar-Sweetened and Artificially-Sweetened Beverages in Relation to Obesity Risk. *Adv. Nutr.* 5, 797–808.

Philippaert, K., Pironet, A., Mesuere, M., Sones, W., Vermeiren, L., Kerselaers, S., Pinto, S., Segal, A., Antoine, N., Gysemans, C., et al. (2017). Steviol glycosides enhance pancreatic beta-cell function and taste sensation by potentiation of TRPM5 channel activity. *Nat. Commun.* 8, 1–16.

Raben, A., Vasilaras, T.H., Møller, A.C., and Astrup, A. (2002). Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 721–729.

Raun, S.H., Henriquez-Olguín, C., Karavaeva, I., Ali, M., Møller, L.L.V., Kot, W., Castro-Mejía, J.L., Nielsen, D.S., Gerhart-Hines, Z., Richter, E.A., et al. (2020). Housing temperature influences exercise training adaptations in mice. *Nat. Commun.* 11, 1–16.

Risdon, S., Roustit, M., Meyer, G., and Walther, G. (2018). Is fasting blood glucose a reliable parameter to investigate the effect of non-nutritive sweeteners on glucose metabolism? *Eur J Clin Nutr.*

Risdon, S., Strock, E., Meyer, G., Marziou, A., Gayraud, S., Riva, C., and Walther, G. (2019). Chronic non-nutritive sweeteners consumption alters lipid metabolism, body composition and arterial vasomotor function: Preliminary data in a healthy rat population. *Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl.* 11, 199–200.

Risdon, S., Meyer, G., Marziou, A., Riva, C., Roustit, M., and Walther, G. (2020). Artificial Sweeteners Impair Endothelial Vascular Reactivity: Preliminary Results In Rodents. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*

Roberts, A., Renwick, A.G., Sims, J., and Snodin, D.J. (2000). Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. *Food Chem. Toxicol.* 38, 31–41.

Romo-Romo, A., Aguilar-Salinas, C.A., Brito-Córdova, G.X., Gómez-Díaz, R.A., and Almeda-Valdes, P. (2018). Sucralose decreases insulin sensitivity in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* 108, 485–491.

Sánchez-Tapia, M., Martínez-Medina, J., Tovar, A.R., and Torres, N. (2019). Natural and Artificial Sweeteners and High Fat Diet Modify Differential Taste Receptors, Insulin, and TLR4-Mediated Inflammatory Pathways in Adipose Tissues of Rats. *Nutrients* 11.

Shvide-Slavin, C., Swift, C., and Ross, T. (2012). Nonnutritive Sweeteners: Where Are We Today? *Diabetes Spectr.* 25, 104–110.

Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaïs, C.A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., et al. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* 514, 181–186.

Sylvetsky, A.C., Bauman, V., Blau, J.E., Garraffo, H.M., Walter, P.J., and Rother, K.I. (2017). Plasma concentrations of sucralose in children and adults. *Toxicol. Environ. Chem.* 99, 535–542.

Tucker, R.M., and Tan, S.-Y. (2017). Do non-nutritive sweeteners influence acute glucose homeostasis in humans? A systematic review. *Physiol. Behav.* 182, 17–26.

Wang, Q.-P., Browman, D., Herzog, H., and Neely, G.G. (2018). Non-nutritive sweeteners possess a bacteriostatic effect and alter gut microbiota in mice. *PloS One* 13, e0199080.

WHO (2017). Obesity and overweight.

RESULTATS ADDITIONNELS

Pour mieux comprendre les résultats d'une consommation chronique d'édulcorants sur le contrôle glycémique et la fonction vasculaire de ces travaux, nous avons conduit des expérimentations complémentaires.

a. Effet aigu de l'ingestion de sucralose sur la réponse métabolique à un test de tolérance au glucose

Contexte et objectif

La perturbation du métabolisme du glucose participe à l'installation du syndrome métabolique et à l'augmentation du risque CV. Lors de notre ETUDE N°2, portant sur les effets de la consommation chronique de sucralose, nous avons observé un effet de cette consommation sur le contrôle de la glycémie.

L'objectif de ce protocole a donc été de décortiquer les mécanismes pouvant participer aux variations métaboliques, observées dans notre étude chronique, via l'ingestion d'un seul bolus de sucralose par gavage oral et dont la concentration correspond à deux fois la DJA chez l'homme.

Matériels et méthodes

Population et protocole expérimental

Après un jeûne de 14 heures (18h00 à 8h00), 20 souris C57BL6/J de 10 semaines ($24,5 \pm 1,19$ g en moyenne) ont été gavées oralement avec soit de l'eau (Water, W) soit de l'eau contenant du Sucralose (Su, 37,1mg/kg). Quinze minutes après ce premier gavage, un test de tolérance au glucose a été effectué, suivis d'un prélèvement sanguin intracardiaque et de la dissection du pancréas pour des analyses biochimiques et immunohistochimiques ultérieures. A la fin du prélèvement, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale.

Procédure de test oral de tolérance au glucose

La mesure de la glycémie à jeun a été effectuée avant le gavage à l'eau ou au sucralose et 15 minutes après. Une fois la mesure relevée, un test de tolérance au glucose a été réalisé et l'évolution de la glycémie a été mesurée à t=10, 20 et 30 minutes après l'HG (1,5g/kg) induite par gavage oral.

Analyses histologiques et biochimiques

Tout de suite après la fin du test de tolérance au glucose, les animaux ont été anesthésiés par inhalation à l'isoflurane (2%, Anestéo, GE Healthcare, France) afin de prélever le sang par ponction intracardiaque et le pancréas 45 minutes après l'induction de l'HG.

○ Dosage de l'insuline sérique

Les échantillons sanguins ont été laissés sur glace pendant 5 minutes puis centrifugés 10 minutes à 4°C (3000 G). Le sérum a ensuite été congelé afin de réaliser le dosage de l'insuline par test ELISA (INSULIN ELISA Kit, 10-1247-01, MERCODIA) (cf. Dosage des taux l'insuline sérique p. 78).

○ Morphologie et capacité de sécrétion insulinaire des îlots β de Langerhans

Une fois le pancréas prélevé, les tissus ont été fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 24 heures. Les échantillons ont ensuite été transférés dans de l'éthanol 70% avant d'être inclus en bloc de paraffine (Robot processeur de tissus STP120) puis mis en cassette (EC350). Enfin des coupes de 5µm d'épaisseur ont été effectuées à l'aide d'un microtome (HM340E), permettant ainsi la phase d'immuno-marquage de ces échantillons. Pour ce faire, les coupes ont d'abord été déparaffinées par passages successifs dans des bains de xylène puis d'éthanol. Suite à cela, un bain à 95°C dans un tampon de citrate à pH 8,8 pendant 20 minutes suivi d'un bain dans du PBS-Tween 20 à 0,1% pendant 5 minutes, ont permis respectivement le démasquage des sites de liaisons ainsi que la perméabilisation des échantillons. Ensuite, les échantillons ont été rincés à trois reprises dans du PBS 1X pendant 5 minutes, puis plongés dans une solution de blocage contenant du BSA pendant une heure à température ambiante, afin de saturer les sites de liaisons non spécifiques des anticorps utilisés. Une fois cette étape terminée, les coupes ont été incubées toute la nuit à 4°C dans une solution de BSA à 4% contenant les anticorps primaires anti-insuline (*anti-insulin guinea pig antibody*) dilués au 1/500^e. Après une étape de rinçage incluant 3 rinçages de 5 minutes dans du PBS 1X, les échantillons ont été incubés une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires (*goat anti-guinea pig antibody*) dilués au 1/1000^e dans une solution de BSA 2% et Dapi dilué au 1/2500^e. Enfin, suite à une dernière étape de rinçage comme décrite ci-dessus, les lames ont été montées au glycérol, pour ensuite être observées et photographiées avec un microscope confocal (Nikon A1R).

Résultats

L'ingestion aiguë de sucralose modifie la tolérance au glucose sans altération de la sécrétion d'insuline chez la souris (Fig. 26A)

Après une période de jeûne, le gavage avec la solution de sucralose influe de manière identique au gavage contrôle (i.e. effectué avec de l'eau) sur la glycémie (Fig. 26B). En effet, une augmentation de ce paramètre est observée dans la même proportion ($16,5 \pm 19,5\%$ pour le groupe eau et $31,6 \pm 24,1\%$ pour le groupe sucralose) dans les deux conditions, 15 minutes après le gavage. Cette variation de glycémie est très probablement liée à la sécrétion de catécholamines en réponse au stress subit par les animaux au moment de la procédure de gavage (Benedé-Ubieto 2020).

Le test de tolérance au glucose (OGTT) dans le groupe ayant consommé du sucralose semble présenter une réponse glycémique inférieure à tous les temps de mesure, bien qu'une tendance statistique soit observée à $t=30$ minutes après le début de la procédure ($P=0,079$). De manière intéressante, les souris préalablement gavées avec du sucralose présentent un calcul d'aire sous la courbe, issu de l'OGTT, inférieur à celui des animaux contrôles (Fig. 26C et 26D). Ce résultat met en avant une influence de la consommation préalable de sucralose sur le contrôle glycémique. Afin d'évaluer la réponse insulinaire, qui joue un rôle majeur dans la régulation des niveaux de glucose sanguin après un OGTT, nous avons réalisé, 45 minutes après le début du test de tolérance au glucose, un prélèvement sanguin intracardiaque et un prélèvement du pancréas.

Ni le niveau de sécrétion d'insuline des cellules bêta pancréatiques, ni les taux sériques d'insuline n'ont présenté de différence entre nos conditions (Fig. 26E et 26F), ne permettant pas d'expliquer les résultats obtenus lors du test de tolérance au glucose dans notre modèle.

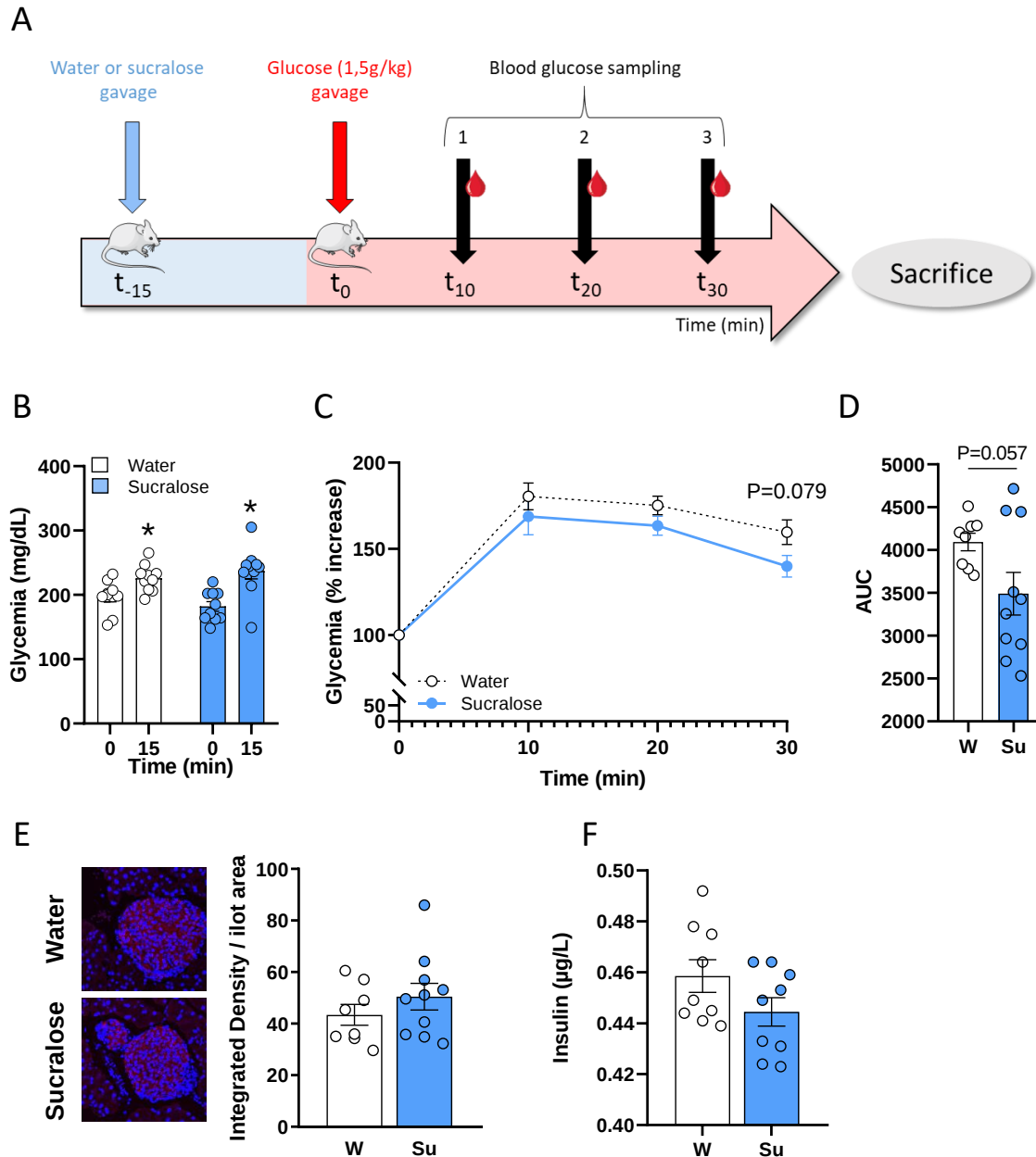


Figure 26 : protocole expérimental et évaluation de la tolérance au glucose chez la souris après une consommation aiguë de sucralose. Comme présenté dans le descriptif du protocole expérimental (A), la glycémie à jeun a été évaluée avant et après la procédure de gavage (B). Un test oral de tolérance au glucose (OGTT) (C) ainsi que la mesure de l'aire sous la courbe associée (D) ont été effectués dans nos deux groupes. Ces mesures ont été complétées par l'étude de la sécrétion d'insuline dépendante des cellules bêta pancréatiques évaluée par technique d'immunohistochimie (E) ainsi que par l'évaluation de l'insulinémie mesurée 45 minutes après le début de l'OGTT (F). W réfère à eau, Su réfère à sucralose. * : $P < 0,05$ contre $t = 0$ minute.

b. Effet aigu de l'exposition vasculaire au sucralose ou à l'acésulfame sur la vasomotricité et la réponse adrénargique

Contexte et objectifs

La dysfonction vasculaire est reconnue comme un marqueur précoce de dysfonction vasculaire. Au cours des deux études menées au pendant cette thèse, nous avons observé une influence de la consommation des édulcorants utilisés sur la fonction vasculaire. Alors que le mélange Ace-K et sucralose a été associé à une altération de la relaxation endothéliale-dépendante en condition d'HG, la consommation chronique de sucralose a permis de potentialiser légèrement cette relaxation. Afin d'expliquer ces résultats, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les édulcorants pourraient avoir un effet direct sur le tissu vasculaire. En effet, des études chez l'homme ont montré que le sucralose et l'Ace-K sont des molécules capables de passer la barrière intestinale. Non seulement ces molécules sont détectables pendant plusieurs heures dans la circulation sanguine après une consommation unique, mais il a été observé que le sucralose pouvait être séquestré à plus long terme dans le tissu adipeux de rat (Walker, *International Programme on Chemical Safety* ; Sylvestry et al., 2017 ; Bornemann et al., 2018).

Le premier objectif de cette partie complémentaire a donc été d'évaluer le potentiel des édulcorants, sucralose et Ace-K, à activer des réponses vasomotrices au niveau macro-circulatoire chez le rat et micro-circulatoires chez l'Homme et de caractériser ces réponses en fonction des édulcorants utilisés.

L'implication du récepteur au goût sucré en tant que médiateur de ces réponses a également été contrôlé au cours de ce protocole (Protocole 1).

Le deuxième objectif de cette étude a été d'évaluer l'impact de ces édulcorants sur la balance contraction/relaxation, en mesurant la réponse adrénargique sur le tissu artériel après l'exposition de celui-ci à différentes concentrations de sucralose ou d'Ace-K (Protocole 2).

Matériels et méthodes

Populations expérimentales

25 rats mâles Wistars de 350 à 450 grammes, ont été anesthésiés avec une injection de pentobarbital sodique (182,2mg/kg i.p.; Doléthal, Vétroquinol) afin de prélever l'aorte thoracique pour l'étude de la fonction vasculaire.

A l'occasion de chirurgies bariatriques, des vaisseaux provenant d'épiploon humain ont été prélevés sur un total de 10 patients (2 hommes et 8 femmes) entre 24 et 59 ans, présentant un IMC >30 (Sleeve ; Cohorte SOON, CHU Grenoble ; Pr. Anne-Laure Borel et Pr. Catherine Arvieux). L'épiploon, également connu sous le nom d'omentum, correspond à deux feuillets de péritoine (grand et petit épiploon), accolés qui permettent de relier deux viscères. Ces feuillets sont très vascularisés et contiennent des micro-vaisseaux (de 50 à 150 μm de diamètre) utilisables pour des mesures de réactivité vasculaire (Fig. 27).

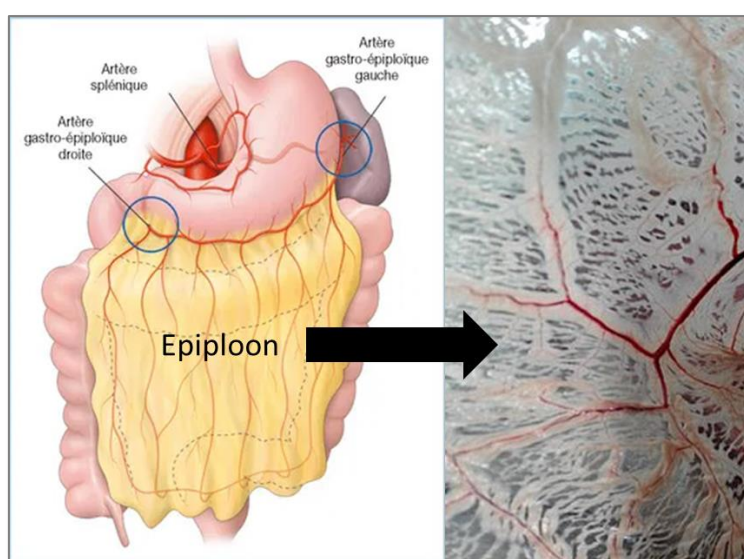


Figure 27 : schéma de l'épiploon (ou omentum) et photographie de sa vascularisation chez l'Homme. Adapté de Ferron et Charitansky, 2011.

Expression génique de TAS1R2 et TAS1R3 par Reverse Transcriptase-qPCR

Les ARNm ont été extraits avec le kit RNeasy (Qiagen). Ils ont été convertis en ADN complémentaires à l'aide d'une enzyme Reverse Transcriptase. La réaction de polymérisation en chaîne a été réalisée sur LightCycler (Roche Scleraxis Diagnostics) en suivant le protocole suivant :

40 cycles composés de 3 étapes :

- 1 : dénaturation à 95°C pendant 10 secondes,
- 2 : appariement des amorces à 60°C pendant 5 secondes,
- 3 : élongation à 72°C pendant 10 secondes.

L'accumulation d'amplicons a été révélée grâce à la sonde fluo Sybergreen (agent intercalant ; kit Power Sybergreen ; Applied biosystems). Pour cibler l'ARNm de TAS1R2, nous avons utilisé l'amorce sens 5'-CTGCTTCGAGTGTGTGGACTG-3' et l'amorce anti-sens 5'-GAAGCAAGCGATGTTGTTCTTGTA-3'. Pour l'ARNm TAS1R3, l'amorce sens était 5'-AAGGCCT GCA GTGCACAAGA-3' et l'amorce anti-sens était 5'-GGCCTTAGGTGGGCATAATAGGA-3'. Pour l'ARNm de contrôle β -actin, l'amorce sens était 5'-AG

GATGCAGAAGGAGATTACTG-3' et l'amorce anti-sens était 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3'. Chaque échantillon a été analysé en triplicat.

Quantification protéique de TAS1R3 dans l'aorte de rongeur

○ Extraction et préparation des échantillons

Lors de leur prélèvement, les aortes de rats et de souris ont été rapidement plongées dans de l'azote liquide puis conservés à -80°C, ce jusqu'à leur utilisation. Afin d'extraire les protéines d'intérêt, les échantillons ont été broyés à l'aide d'un putter en verre, dans un tampon d'extraction SB à 4°C (50mM de Tris-HCl, pH=6.7, 1% dodécylsulfate de sodium (SDS), 10% de glycérol) contenant un inhibiteur de protéases (Protease inhibitor cocktail ; Sigma Aldrich) et un inhibiteur de phosphatase (NaOV ; Fisher Scientific). L'homogénat obtenu a ensuite été centrifugé à 17000 G pendant 10 minutes, afin d'obtenir un surnageant ne contenant que des éléments cytosoliques.

○ Dosage des protéines

L'évaluation de la concentration en protéines des échantillons, a été réalisée avec un kit de dosage BCA (*Bicinchonidic acid*) (Pierce® BCA Protein Assay Kit ; Thermo Scientific). Le principe de ce dosage repose sur l'association du BCA aux ions Cu^+ , obtenus par la réduction d'ion Cu^{2+} par les protéines présentes dans l'échantillon. Le complexe BCA- Cu^+ présente une forte absorbance à 562nm, proportionnelle à la concentration protéique de l'échantillon. Ainsi, grâce à une gamme étalon BSA (*Bovine Serum Albumin*), de concentration protéique connue (allant de 0 à 2mg/mL), la concentration en protéines de chaque échantillon a été mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 562nm.

○ Western Immunoblotting

La technique du Western Blot permet de mesurer le niveau d'expression d'une protéine d'intérêt dans un échantillon donné. Grâce à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire, leur différence de charge ayant été annihilée par le SDS présent dans le tampon SB, précédemment détaillé. A chaque échantillon a été ajoutée une solution de β -mercaptoéthanol (5%) permettant de dénaturer les protéines, ainsi que du bleu de Bromophénol (0,2%) apportant une certaine densité à l'échantillon, densité nécessaire à sa migration le long du gel. Les échantillons ont ensuite été placés au bain-marie à 95°C afin de dénaturer complètement les complexes protéiques. Enfin, les échantillons ont été déposés sur le gel, en prenant soin de normaliser la quantité de protéines présentes dans chacun d'eux. Un marqueur de poids moléculaire a également été déposé sur le gel (EZ-Run™ Pre-Stained Rec Protein Ladder ; Fisher Scientific). Une fois la migration terminée, les protéines ont été transférées sur une membrane de Polyfluorure de vinylidène (PVDF) à l'aide d'un appareil de transblot (Bio-Ras transfert apparatus ; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Les membranes ont été incubées sous-agitation, à température ambiante, pendant 1

heure, dans une solution de blocage (BSA 3%) préparée avec du TBS-T (TrisBuffered saline, 0,05% Tween 20, pH=7,5), afin de saturer les sites non spécifiques. Une fois cette étape terminée, les membranes ont été rincées avec du TBS-T, puis incubées toute une nuit sous-agitation à 4°C, avec l'anticorps spécifique de TAS1R3 (1/5000^e, anticorps primaire). Au terme de l'incubation avec l'anticorps primaire, les membranes ont été rincées avec du TBS-T, puis incubées pendant 1 heure avec un anticorps secondaire (1/10000^e) à température ambiante. Les membranes ont à nouveau été rincées puis immergées dans un réactif luminescent ECL (Enhanced Chemiluminescent) ou ECL+ (SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrate), qui au contact de l'enzyme HRP, contenu dans l'anticorps secondaire, produit une émission photonique. L'intensité de la réaction de chimiluminescence a été détectée sur un film radiographique, qui une fois scanné a permis de quantifier l'intensité du signal grâce au logiciel Image J (ImageJ, NIH, USA). Le niveau d'expression des protéines étudiées a été normalisé par le niveau d'expression de la GAPDH, utilisée comme protéine de référence puisque son expression ne varie pas dans le temps.

Etude de la réactivité vasculaire

Chez le rat, l'étude de la vasomotricité artérielle a été évaluée dans des cuves d'organes isolées (cf. ETUDE DE LA REACTIVITE VASCULAIRE AORTIQUE EX VIVO, p. 76). Dans le but de caractériser notre modèle et étant donné le rôle majeur de l'endothélium dans la vasomotricité, toutes les mesures sur ce modèle ont été faites en présence et en l'absence de ce composé cellulaire.

Chez l'Homme, l'étude de la vasomotricité a été mesurée via l'utilisation d'un myographe (DMT, 620M Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark), appareil permettant de mesurer une tension isométrique exprimée grammes. Chaque anneau a pu être fixé, à l'aide de deux fils de tungstène (25µm de diamètre) traversant la lumière du segment d'artère. Ces fils ont ensuite été vissés sur chacun des supports de l'appareil qui se font face, dans une cuve contenant 5mL d'une solution de KH thermostatée (37°C) et aérée (95% O₂, 5% CO₂). Chacun des fils a été ainsi « solidarisé » avec l'un des supports, dont l'un est fixe et l'autre mobile. Le support fixe est relié à un capteur de force qui mesure la variation de tension générée par le tonus contractile des CMLV et convertit cette tension en un signal électrique traité informatiquement par le logiciel LabChart (AD Instruments) après amplification et numérisation par un système d'acquisition de données (AD instruments). Le support mobile est relié à une vis micrométrique graduée qui permet, en la tournant, d'imposer un certain diamètre au vaisseau.

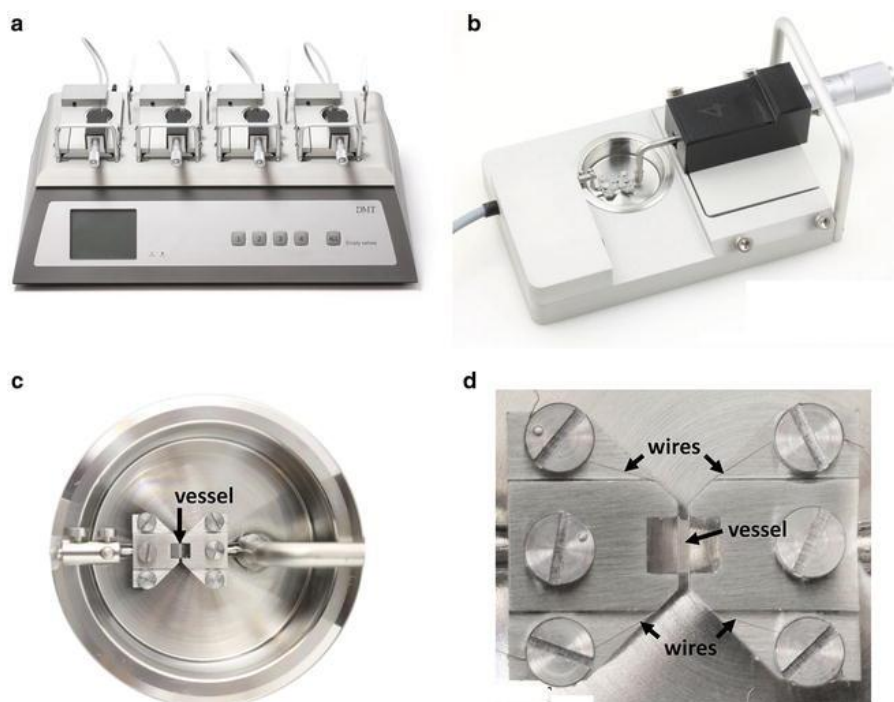


Figure 28 : Photographies représentatives des différentes composantes du myographe DMT. a) Vision d'ensemble du dispositif, b) Chambre du myographe, c) Cuve avec montage d'un vaisseau, d) Zoom sur le montage du vaisseau avec apparition des fils de tungsten.

Il est à noter que, pour les mesures effectuées sur les tissus humains, une étape de normalisation de la tension appliquée sur les vaisseaux a été nécessaire avant toutes mesures, du fait de l'hétérogénéité des prélèvements. Pour ce faire, la longueur de mise en tension de chaque vaisseau a été fixée pour correspondre à une valeur de pression de 100mmHg, en prenant en compte l'équation suivante : $Pression\ effective = Tension\ pariétale / (circonférence\ interne / (2 \cdot \pi))$.

Une fois la tension du vaisseau réglée, les protocoles de stabilisation et de mesures expérimentales ont été effectués. Ainsi, le protocole pharmacologique présenté ci-après est commun à nos deux modèles et, comme décrit précédemment, s'appuie sur deux protocoles distincts afin de répondre à nos objectifs.

Après la période de stabilisation des anneaux, ceux-ci ont été incubés dans une solution de Krebs supplémentée en KCl (80mM), avant la réalisation d'un test d'intégrité (PE, 1.10^{-6} M, puis ACh, 1.10^{-5} M). Une fois ces pré-tests effectués, les protocoles de mesure ont été réalisés.

Un premier protocole (**Protocole 1**) a été réalisé afin de tester les effets vasomoteurs directs du sucralose et de l'Ace-K. Afin de tester les effets vasodilatateurs du sucralose, des anneaux vasculaires ont été pré-contractés à la PE (1.10^{-6} M) et une dose-réponse au sucralose (10μ M à 30mM)

a été réalisée. Afin de tester les effets vasoconstricteurs de l'Ace-K des anneaux d'aorte en tension basale ont été soumis à 2 doses croissantes d'Ace-K (10 et 30mM). Afin de tester l'implication des récepteurs au gout sucré dans la réponse vasomotrice induite par le sucralose et l'Ace-K nous avons réalisé ces mêmes tests en incubant préalablement nos anneaux dans de la gurmarine (10 mM).

Lors d'un second protocole (**Protocole 2**), les anneaux ont été pré-incubés 30 minutes avec du sucralose ou de l'Ace-K à des concentrations allant de 100μM à 10mM avant l'application d'une dose-réponse à la PE (1.10^{-9} à 1.10^{-6} M), permettant d'observer l'effet de ces édulcorants sur la réponse adrénergique vasculaire.

Résultats

Le sucralose et l'acésulfame de potassium modulent, de façon spécifique selon la molécule, la fonction vasculaire

L'exposition des aortes à l'Ace-K, avec ou sans endothélium, est associée à un effet contractile majeur, notamment à 30mM (Fig. 29A). Au contraire, l'exposition au sucralose d'anneaux, préalablement contractés à la PE, s'accompagne d'un phénomène de vasorelaxation. Cependant, cette relaxation semble être masquée par la perte de contraction inhérente à l'action de l'endothélium (Fig. 29B). En effet, c'est seulement lorsque l'endothélium est retiré qu'un effet vasodilatateur significatif du sucralose est observé (Fig. 29C). Quel que soit l'édulcorant utilisé (*i.e.* sucralose ou l'Ace-K), l'effet observé semble dépendant de la dose.

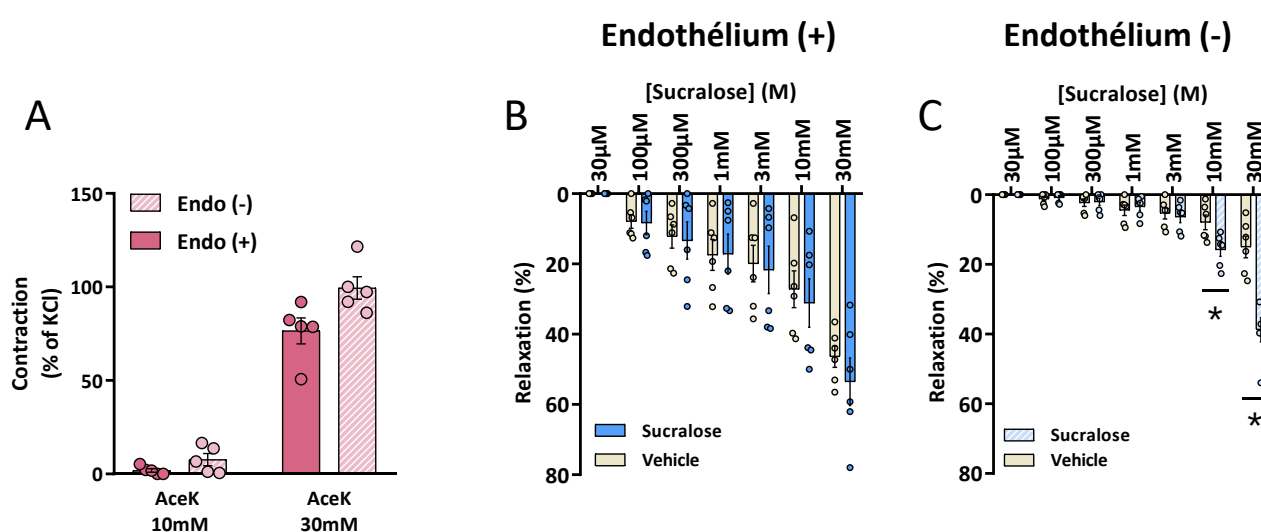


Figure 29 : Effet de l'exposition au sucralose et Ace-K sur la vasomotricité d'aortes de rat pourvues ou non d'endothélium. * : $P < 0,05$

L'exposition à l'acésulfame de potassium, mais pas au sucralose, potentialise la réponse adrénérergique vasculaire

Afin de compléter ces résultats, nous avons ensuite évalué l'effet de ces molécules édulcorées sur la capacité de réponse adrénérergique des aortes. Cette réponse joue un rôle majeur dans la balance vasomotrice, qui est affectée en conditions pathologiques. Bien qu'aucun effet n'ait été observé avec les doses les plus faible d'Ace-K, les doses les plus fortes (1 et 10mM) ont entraîné une exacerbation de la réponse contractile à la PE (Fig. 30A et 30B). Cet effet a principalement été observé en absence d'endothélium (Fig. 30A). Malgré une tendance à observer un effet anti-contractile à 10mM, aucun effet significatif de l'exposition au sucralose n'a été observé, que ce soit en présence ou en absence d'endothélium (Fig. 30C et 30D).

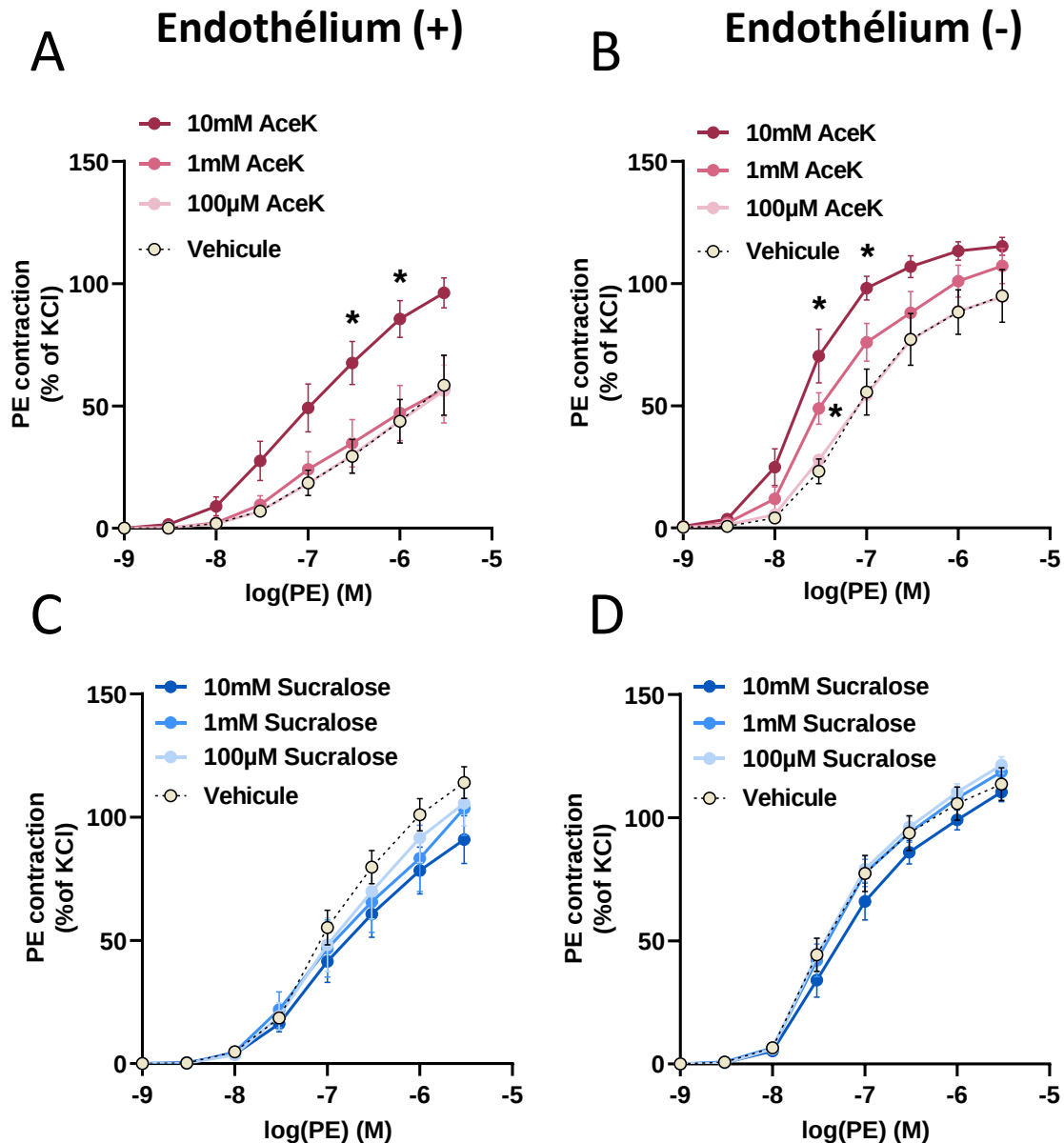


Figure 30 : Effet de 30 minutes d'exposition à l'Ace-K ou au sucralose sur la réponse adrénargique d'aorte de rat pourvue ou non d'endothélium vasculaire. * : $P < 0.05$ contre véhicule

Les récepteurs au goût sucré, sensibles à l'Ace-K et au sucralose, sont exprimés dans le tissu aortique de rongeurs

Tel que cela a été décrit dans la littérature, nous avons confirmé l'expression génique et protéique des sous-unités TAS1R2 et TAS1R3 (composantes du récepteur au goût sucré) au niveau stomacal et intestinal chez la souris (O'Brien et al., 2018 ; Fan et al., 2020). De plus, à notre connaissance, aucune étude n'avait mis en avant l'expression de ces composés au niveau aortique comme nous avons pu le montrer chez la souris et chez le rat (Fig. 31A et 31B). De ce fait, nous avons ensuite évalué l'effet du sucralose et de l'Ace-K sur la réponse vasomotrice, en émettant l'hypothèse que cet effet serait médié par l'activation des récepteurs au goût sucré.

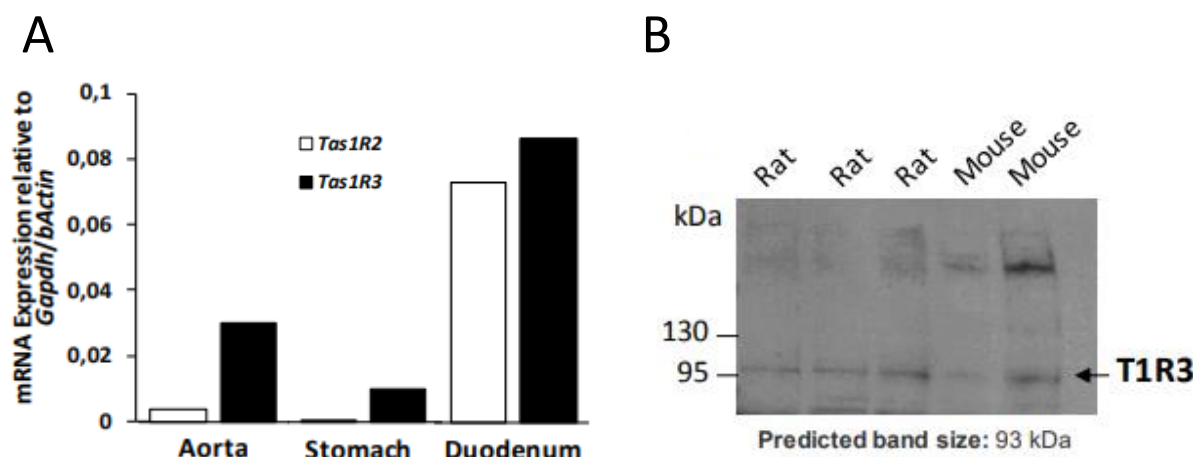


Figure 31 : Expression génique et présence des sous-unités fonctionnelles du récepteur au goût sucré dans le tissu aortique, stomacal ou duodénal de rongeur. L'expression génique et protéique des sous-unités composant le récepteur au goût sucré ont été évaluées par PCR quantitative (Reverse transcriptase-qPCR, $n=1$ par analyse) dans le tissu aortique, stomacal et duodénal de souris et par western blot ($n=2-3$ animaux/groupe) dans le tissu aortique de souris et de rats.

L'action du sucralose et de l'acésulfame de potassium sur la vasomotricité artérielle ne semble pas dépendre de l'activation des récepteurs vasculaires au goût sucré

Afin de tester notre hypothèse selon laquelle ces réponses vasculaires résultent de l'interaction du sucralose et de l'Ace-K avec les récepteurs du goût sucré localisés au niveau vasculaire, nous avons inhibé ces derniers à l'aide d'un agent spécifique. En effet, la gurmarin cible spécifiquement la sous unité TAS1R3 du récepteur au goût sucré, sous unité pour laquelle le sucralose comme l'Ace-K ont une affinité particulièrement importante en comparaison avec la sous unité TAS1R2. Aucun effet de la gurmarin n'a été observé que ce soit avec le sucralose ou l'Ace-K. Ce résultat semble montrer que l'effet contractile ou relaxant médiée par l'Ace-K ou le sucralose respectivement ne semble pas dépendant de l'activation des TAS1R3. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer la significativité de nos résultats (Fig. 32A et 32B).

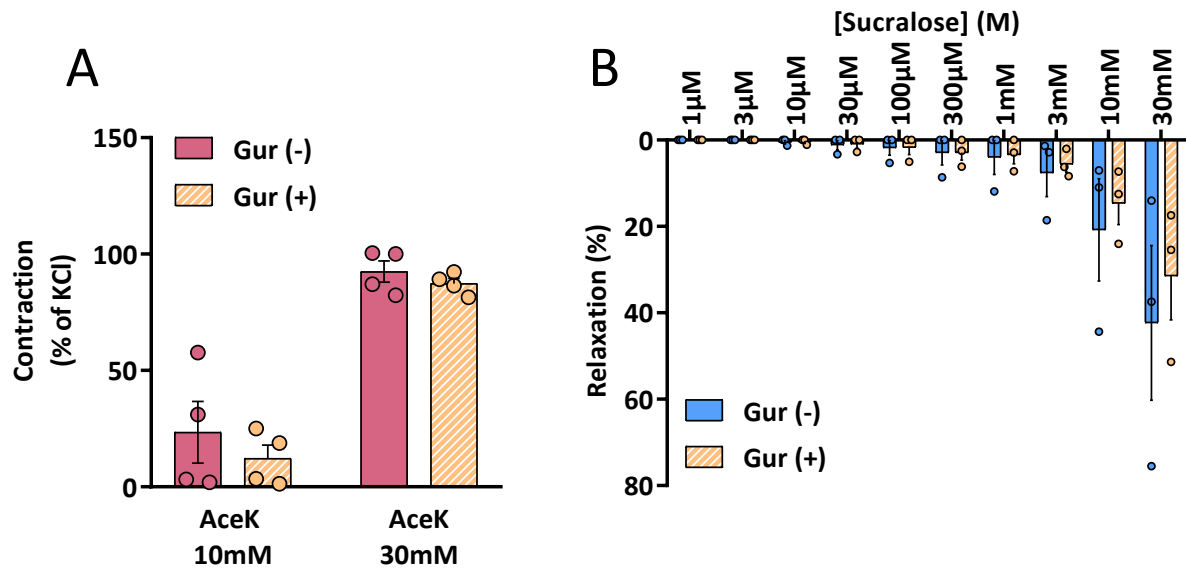


Figure 32 : implication de la sous-unité TAS1R3 dans la vasomotricité observée après exposition des tissus à l'Ace-K ou au sucralose

Expression de la sous-unité TAS1R3 au niveau du tissu vasculaire humain et modulation de la vasomotricité par le sucralose et l'acésulfame de potassium

Ces études supplémentaires permettent de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les édulcorants interagissent avec la composante vasculaire. Ces résultats semblent d'autant plus intéressants que les effets de l'Ace-K et du sucralose sur la vasomotricité artérielle chez le rat semblent transposables à l'homme, pour qui la présence de TAS1R2/3 a été identifiée dans le tissu sous cutané, richement vascularisé (Fig. 33A). En effet, les effets vasomoteurs de l'Ace-K ou du sucralose, préalablement observés sur le modèle murin, sont conservés chez l'homme (Fig. 33B et 33C).

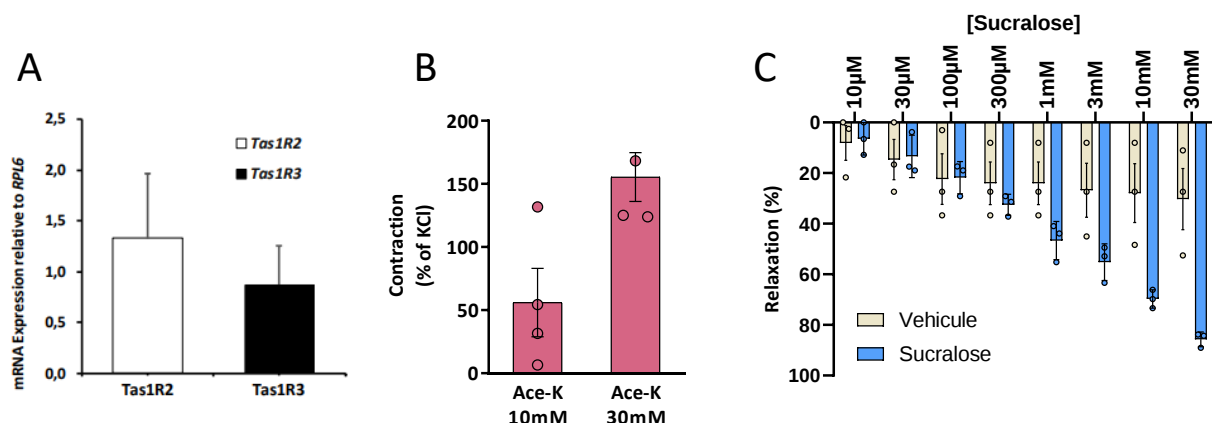


Figure 33 : Expression génique des sous unités fonctionnelles du récepteur au goût sucré et effet du sucralose et de l'Ace-K au sein du tissu vasculaire humain.

DISCUSSION

DISCUSSION

Une consommation de sucres excessive est aujourd'hui reconnue comme étant l'un des principaux facteurs de risque CV modifiables. En effet, la consommation de sucre participe à l'installation d'un déséquilibre dans la balance énergétique, à l'origine de nombreuses co-morbidités cardiométaboliques, en commençant par l'obésité. Au regard de ce constat, des stratégies telles que la substitution du sucre par des édulcorants, ont été proposées.

Malgré l'utilisation répandue de ces molécules, il n'est pas clairement établi aujourd'hui que ces édulcorants soient sans risque pour la santé cardiométabolique. En effet, la littérature récente sur des études de cohortes alerte sur l'augmentation du risque de mortalité, notamment CV, qui semble être associée à la consommation fréquente de boissons édulcorées (Malik et al., 2019 ; Mullee et al., 2019 ; Mossavar-Rahmani et al., 2019 ; Qin et al., 2020 ; Yin et al., 2020 ; Chazelas et al., 2021). Toutefois, les liens de causalité entre ces deux facteurs ne sont pas clairement déterminés, ni à l'échelle expérimentale ni à l'échelle humaine. Ce travail de thèse a ainsi contribué à la caractérisation des effets cardiométaboliques de deux formulations édulcorantes majoritairement consommées dans l'alimentation générale.

Ainsi, dans la première partie de cette discussion nous confronterons les résultats de ce travail de thèse avec la littérature scientifique afin de préciser l'éclairage qu'ils apportent sur l'usage des édulcorant comme stratégie de remplacement des sucres dans l'alimentation. Puis, dans un deuxième temps nous discuterons de la grande variété des designs expérimentaux et de son impact sur l'hétérogénéité des résultats reportés dans la littérature.

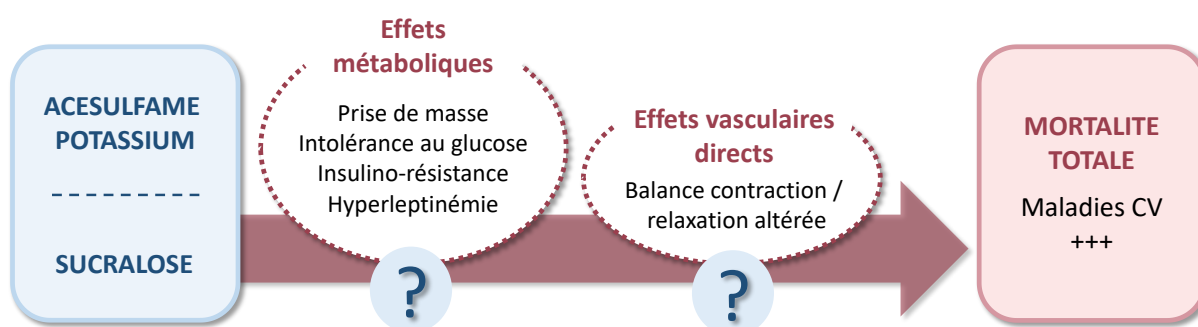


Figure 34 : Hypothèses des cibles métaboliques et vasculaires des édulcorants pouvant participer à la mortalité cardiovasculaire

1. L'utilisation des édulcorants peut-elle être efficace dans la prévention du risque métabolique et cardiovasculaire ?

Sur la base des données épidémiologiques précitées et montrant une association entre consommation d'édulcorants et risque CV indépendamment d'autres facteurs de risque, notre hypothèse était que cette association pourrait être expliquée par une action directe des édulcorants sur la fonction de la paroi vasculaire.

Ces mêmes études épidémiologiques et deux meta-analyses plus récentes (Malik et al., 2019 ; Mullee et al., 2019 ; Mossavar-Rahmani et al., 2019 ; Qin et al., 2020 ; Yin et al., 2020) montrent également une association entre consommation d'édulcorants et augmentation du risque d'obésité et de DT2. Etant donnée les conséquences bien connues de l'obésité, de l'HG, des dyslipidémies et d'autres facteurs de risque cardiométaboliques sur la fonction endothéliale vasculaire, une hypothèse alternative était que cette association puisse être expliquée par une action indirecte des édulcorants qui impliquerait des conséquences métaboliques négatives et secondairement des répercussions négatives sur les fonctions vasculaires.

Le sucralose et l'acésulfame de potassium peuvent-ils impacter la balance vasomotrice ?

En effet, lors de cette thèse, nous avons remarqué que la consommation chronique d'un mélange d'édulcorants (Ace-K et sucralose) pendant 10 semaines était à même d'altérer la fonction vasculaire. Toutefois ces altérations n'étaient observées qu'en condition de stress. En effet, chez le rat ayant consommé de l'eau supplémentée avec ce mélange édulcoré, la capacité de relaxation vasculaire était altérée uniquement suite à un stress hyperglycémique.

Toutefois, lorsque nous avons reconduit ce protocole chez des souris ayant été exposées 12 semaines à une boisson ne contenant cette fois que du sucralose, nous n'avons pas observé d'effet délétère de cette consommation sur la fonction vasculaire en condition basale. Au contraire, nous avons remarqué une légère amélioration de la vasorelaxation chez les groupes ayant consommé cet édulcorant en condition normoglycémique, ce qui n'était pas observé chez le rat. Une de nos hypothèses était que les altérations potentiellement compensées en condition basale pourraient être observées dans un contexte de pathologie chronique tel que notre modèle de régime HF. Cependant une légère amélioration de la vasorelaxation était également observée chez les souris consommant un régime HF. Nous avons également voulu voir si d'éventuelles altérations, semblables à celles observées dans notre modèle consommant le mélange sucralose/Ace-K, pouvaient être observées en réponse à

un stress hyperglycémique. Cependant, notre modèle de stress hyperglycémique a induit chez nos souris des altérations majeures de la vasomotricité ne permettant plus de discriminer de différences entre les groupes. Par conséquent ces 2 travaux de thèse présentent des effets antagonistes, puisque l'association de l'Ace-K et du Sucralose semblait entraîner une altération de la balance contraction/relaxation en faveur de la contraction alors que notre seconde étude s'intéressant spécifiquement au sucralose met en avant des effets favorisant la vasorelaxation de cet édulcorant.

Afin d'investiguer les divergences dans ces résultats nous avons conduit des travaux complémentaires testant les effets vasomoteurs directs de ces édulcorants ainsi que leurs effets indirects sur la balance pro/anti contractile lors d'une stimulation α -adrénergique. De manière intéressante, l'effet antagoniste de ces molécules a été confirmé lors de notre étude complémentaire sur la fonction vasculaire. Lors d'expositions directes d'anneaux d'aortes à des doses croissantes d'édulcorants, nous avons observé qu'à partir de 10mM, l'Ace-K et le sucralose étaient capables d'induire respectivement la contraction et la relaxation du tissu vasculaire. En accord avec les résultats de notre étude n°2 chez les souris exposées de façon chronique au sucralose, l'exposition aiguë à cette molécule n'a pas eu d'impact sur la réponse adrénérergique. Au contraire, l'Ace-K à 1 et 10mM, a permis de potentialiser la réponse adrénérergique de nos vaisseaux.

Lorsque l'on se replace dans le contexte clinique, on s'aperçoit que la concentration maximale plasmatique retrouvée pour l'Ace-K est de 1mM pour 33mg ingéré, c'est-à-dire une quantité pouvant correspondre à celle d'une boisson de 330mL (Walker, *Inchem* ; Sylvetsky et al., 2017 ; Young et al., 2017). La concentration plasmatique du sucralose est quant à elle beaucoup moins importante, de l'ordre du micromolaire (1,4 μ M) après l'ingestion de 250mg correspondant à 1,3L de boisson édulcorée environ (Sylvetsky et al., 2017 ; Young et al., 2017).

Ainsi, au regard des données cliniques et selon nos observations, il n'est pas impossible de considérer que la consommation d'une seule boisson contenant de l'Ace-K puisse rendre plus sensible la composante vasculaire aux composés adrénérergiques, tels que l'adrénaline ou la noradrénaline. De plus, nos résultats suggèrent que la prise d'Ace-K chronique couplée à une charge glycémique, telle que c'est le cas lors d'un repas, pourrait être à l'origine d'une altération de la fonction vasculaire

Sur le plan mécanistique, des travaux de l'équipe de Chichger suggèrent que les édulcorants puissent impacter la fonction des cellules endothéliales pulmonaires via l'activation des récepteurs au gout sucré TAS1R3 (Harrington et al., 2018 ; Lizunkova et al., 2018). La transposabilité de ces résultats au territoire vasculaire n'avait jamais été testée jusqu'à lors. Dans notre étude additionnelle sur les effets aigus, les résultats obtenus avec la gurmérine, un inhibiteur spécifique des récepteurs TAS1R3, suggèrent que ces récepteurs ne sont impliqués ni dans les effets vasomoteurs de l'Ace-K ni du

sucralose. Les récepteurs au goût amer PLC sont également une cible cellulaire potentielle. En effet, certains édulcorants, incluant l'Ace-K, sont également connus pour interagir avec les récepteurs au niveau de la langue. Cependant, il a récemment été mis en évidence que ceux-ci sont également exprimés au niveau de la paroi vasculaire et que leur activation par des agonistes spécifiques (i.e. chloroquine et quinine) induit une réponse vasomotrice (Chen et al., 2017).

L'ensemble de ces données sur l'Ace-K semble montrer un effet direct de cette molécule sur la fonction vasculaire. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour préciser dans un premier temps les voies de signalisation activée par l'Ace-K au niveau vasculaire et dans un deuxième temps vérifier la transposabilité de ces hypothèses chez l'Homme.

Concernant le sucralose, nos résultats suggèrent un rôle minime de celui-ci sur la fonction vasculaire. Cela est en cohérence avec les données chez l'homme pour qui la prise aiguë ne semble pas modifier les capacités vasomotrices rapportées par la technique de *Flow Mediated Dilation*, bien que cette étude n'ait pas donné d'indications sur la dose de sucralose ingérée (Memon et al., 2014).

De plus, dans nos différentes études, les effets vasculaires du sucralose n'ont été observés que pour des concentrations importantes d'édulcorant, qui semblent difficiles à atteindre *in vivo*. En effet, bien que la quantité d'édulcorant plasmatique n'ait pas été dosée chez nos souris, il a été montré chez l'homme que seul 20% de la dose ingérée atteint la circulation systémique, ce qui correspondrait à environ 2,86mg si ce calcul était transposable à notre modèle, soit une concentration plasmatique de 7,2nM (Roberts et al., 2000 ; Sylvestsky et al., 2017). On remarquera que ces concentrations restent très faibles malgré que l'ingestion moyenne quotidienne de sucralose atteignait au maximum deux fois la DJA chez l'homme, soit 31,7mg/kg/jour. Toutefois, il est important de considérer que bien que la concentration circulante de sucralose apparaisse moindre, des données montrent une séquestration de ce composé au niveau du tissu adipeux (Bornemann et al., 2018). Aucune information n'est cependant disponible quant à un éventuel effet de cette séquestration sur la composante vasculaire ou le tissu adipeux lui-même. Néanmoins, il semble essentiel de clarifier cette question étant donné l'influence du tissu adipeux dans le maintien de l'homéostasie métabolique.

En réponse à notre première hypothèse, nos données suggèrent que l'Ace-K, plus que le sucralose pourrait être à l'origine d'effets vasomoteurs directs.

Quel rôle pour le sucralose et l'acésulfame de potassium dans la régulation du stockage énergétique ?

Tel qu'observé lors de l'étude de la fonction vasculaire, le mélange Ace-K sucralose a montré des effets antagonistes à ceux du sucralose seul avec une augmentation des masses adipeuses, particulièrement au niveau du tissu sous-cutané et dans une moindre mesure sur le tissu péri-rénal. Ce résultat préliminaire suggère que la consommation de ce mélange d'édulcorant, même dans le cadre d'un régime équilibré, peut influencer sur la répartition des masses adipeuses. L'une de nos perspectives consiste en la reconduction d'une étude chronique chez la souris telle que notre étude n°2, en utilisant cette fois l'Ace-K dans notre modèle expérimental afin de caractériser plus en détail les observations faites au cours de cette étude préliminaire. Néanmoins, dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes principalement intéressés à la caractérisation des effets du sucralose sur l'homéostasie métabolique des lipides et du glucose.

Bien que son impact sur la fonction vasculaire ne semble pas être majeur, l'ingestion du sucralose semble associée à des modifications au niveau de la prise en charge de l'apport nutritionnel, que ce soit au niveau de son absorption, de sa régulation ou encore de son stockage. Ainsi, pour évaluer son taux de participation dans le développement des maladies métaboliques nous avons travaillé avec deux types de populations animales, l'une sous régime standard d'animalerie, équilibré et pauvre en lipides, l'autre sous régime riche en graisse afin d'exacerber la dysfonction métabolique.

Nos résultats ont démontré qu'une consommation chronique de sucralose dans une concentration proche de la DJA, n'a pas d'effet sur la masse et la composition corporelle alors que d'autres études montrent une augmentation significative du poids de rats nourris au sucralose, suggérant l'implication de processus d'adipogenèse (Sánchez-Tapia et al., 2019 ; Bornemann et al., 2018). Néanmoins, l'utilisation du sucralose en parallèle avec le régime HF limite drastiquement l'augmentation de la masse corporelle et l'accumulation de tissu adipeux viscéral. Ces résultats sont conformes aux données récentes obtenues chez des rats mais également chez l'humain où la consommation de sucralose permet de réduire la masse des animaux nourris avec un régime à base d'HF, ainsi que des patients obèses en comparaison avec la consommation de sucre (Sánchez-Tapia et al., 2019 ; Higgins et Mattes, 2019). De manière intéressante, ces résultats chez l'obèses n'ont pas été retrouvés avec les autres édulcorants utilisés dans cette étude (e.i. saccharine, aspartame, Rebaudioside A), soulignant un effet spécifique au sucralose (Higgins et Mattes., 2019). Le niveau d'atteinte métabolique du tissu adipeux de nos animaux ayant consommé du sucralose, quantifié par la taille des adipocytes viscéraux, est apparu réduit par rapport aux autres groupes HF, en cohérence avec nos résultats sur la masse corporelle. Toutefois, ce résultat est une fois de plus en contradiction

avec Sánchez-Tapia et al. qui décrivent dans leur modèle HF une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques associé à une hyperleptinémie (Sánchez-Tapia et al., 2019). Il est tout de même intéressant de noter que le modèle de Sánchez-Tapia diffère du nôtre sur plusieurs points dont la concentration en sucralose, la durée de l'étude et la proportion de graisse dans le régime alimentaire (1,5% contre 0,017% [sucralose] ; 4 contre 3 mois ; 45% contre 60%). A l'heure actuelle, on ignore si la consommation de sucralose peut agir par des mécanismes intrinsèques, notamment lors de sa séquestration dans le tissu adipeux, pour influencer ces paramètres et favoriser l'inflammation et la résistance à l'insuline. Toutefois, les valeurs de leptinémie étant préservées dans notre groupe HF-Su suggèrent une absence de phénomène inflammatoire au niveau du tissu adipeux dans ce groupe.

L'hypothèse émise nous permettant d'expliquer nos résultats est basée sur la qualité hautement lipophile du sucralose mentionnée par Bornemann et al., ainsi que par l'équipe de Sánchez-Tapia. Lors de l'analyse de nos résultats, nous avons remarqué que la teneur en lipides dans les fèces chez les souris HF-Su était plus élevée que chez les souris HF ayant consommées de l'eau ou du saccharose. Ainsi, il est probable que la faible concentration de sucralose associée à une forte teneur en graisses dans notre modèle pourrait entraîner un taux d'absorption du sucralose plus faible que dans le modèle de Sánchez-Tapia et al., où la proportion de gras est plus faible et le taux de sucralose plus élevé, ou encore dans celui de Bornemann et al., ce dernier ayant nourri des rats avec un régime alimentaire standard. De même, cela pourrait être cohérent avec un taux d'absorption de sucralose plus élevé dans le groupe NC, car ce régime est moins riche en graisses et le taux de lipides fécaux était plus faible dans ce groupe par rapport aux autres groupes.

Ainsi, nous ne pouvons pas exclure le fait que 12 semaines de consommation de sucralose pourraient être associées à une accumulation de sucralose dans les tissus adipeux dans nos deux groupes de régime alimentaire et en particulier chez ceux nourris avec le régime NC. Cela suggère en outre que si cette accumulation existe dans notre modèle, plutôt que le stockage de graisses induit, la consommation de sucralose pourrait participer à une inflammation de faible intensité, connue pour favoriser la résistance à l'insuline.

Quel rôle pour le sucralose et dans le contrôle de la glycémie ?

Dans notre étude, lorsque des souris ont été nourries avec un régime alimentaire standard, naturellement pauvre en matières grasses, et une boisson à base de sucralose, nous avons observé une légère diminution de la sensibilité à l'insuline et une augmentation de la régulation du glucose en réponse à un test oral de tolérance au glucose, par rapport à l'eau ou au saccharose. Cela corrobore une fois de plus notre hypothèse selon laquelle l'absorption de sucralose dans les groupes NC est associée à une inflammation de faible degré dans le tissu adipeux, favorisant la résistance à l'insuline. Bien que l'insulinémie à jeun n'ait pas augmentée, contrairement à ce que nous aurions pu attendre au vu de la réduction plus rapide de la glycémie après le test de tolérance au glucose par voie orale, d'autres études chez l'animal et l'homme ont décrit une association entre la consommation de sucralose pendant respectivement 4 mois ou 2 semaines et l'hyperinsulinémie (Sánchez-Tapia et al., 2019 ; Lertrit et al., 2018 ; Brown et al., 2009 ; Pepino et al., 2013 ; Sylvetsky et al., 2016). Toutefois, cet effet peut être attribuable non seulement au sucralose mais aussi à d'autres édulcorants puisque Philippaert et al. ont observé une réponse similaire avec les glycosides de stéviol, des édulcorants que l'on trouve dans la plante de stévia (Philippaert et al., 2017). Dans le cadre d'un régime alimentaire à base de HF, notre étude montre que la consommation de sucralose préserve la dérive de métabolisme (glycémie à jeun et réponse au test de tolérance au glucose) causée par le régime HF. De même, la sensibilité à l'insuline était également significativement plus élevée après la consommation de sucralose, ce qui était en cohérence avec un taux d'insuline à jeun plus faible dans ce groupe mais pourrait également être dû à un statut pro-inflammatoire limité en raison d'une réduction de l'absorption intestinale du sucralose.

Ici, nous avons montré le potentiel du sucralose à agir comme stratégie de prévention des altérations métaboliques induites par un régime alimentaire riche en graisses et la consommation de saccharose. Néanmoins, il est important de noter que chez les patients obèses sans exposition préalable à un édulcorant artificiel, la consommation de sucralose a exacerbé la réponse glycémique et la sécrétion d'insuline après un stress hyperglycémique par rapport à leur contrôle (Pepino et al., 2013). Cela souligne l'importance du modèle de conception expérimentale, car les effets bénéfiques du sucralose sur la régulation du glucose pourraient dépendre de l'état métabolique des individus. En outre, il reste à déterminer si le sucralose affecte la sécrétion des hormones impliquées dans l'homéostasie du glucose.

La caractérisation de ces variations métaboliques est essentielle pour mieux comprendre comment la consommation d'édulcorants artificiels peut participer au risque CV décrit dans les données épidémiologiques récentes.

2. Importance du design expérimental dans l'évaluation des effets cardiométaboliques des édulcorants

Ces 10 dernières années, plus de 7000 études ont été publiées chaque année sur le sujet des édulcorants et pourtant de nombreuses études présentent encore des résultats contradictoires ne permettant pas d'établir un diagnostic clair sur l'impact de ces molécules sur la santé cardiométabolique. Nous avons identifié plusieurs éléments qui sont susceptibles d'expliquer l'hétérogénéité des résultats présentés dans la littérature.

Spécificité de chaque molécule

Dans la grande majorité des cas, les effets associés à l'exposition à des édulcorants sont rapportés comme un effet classe « pharmacologique » qui s'appliquerait à l'ensemble des édulcorants (Tucker et Tan 2017). Or, chaque édulcorant possède une structure qui lui est spécifique, et qui est en mesure d'influencer sa cinétique d'absorption et les éventuelles réponses métaboliques qui lui sont associées. Ainsi, chez le patient obèse, Higgins et Mattes ont montré une évolution de la variation de masse corporelle qui était différente selon l'édulcorant consommé par les sujets (Higgins et Mattes 2019). Il semble donc essentiel de considérer chaque édulcorant, mais également chaque association d'édulcorants comme un complexe à part entière ayant des effets propres. Ainsi, dans notre étude nous avons choisi de cibler le sucralose, qui est aujourd'hui l'édulcorant intense le plus populaire du marché, en utilisation seule ou associée à l'Ace-K comme cela est majoritairement le cas dans les boissons « sans sucres ».

Application d'un stress

Un deuxième point déterminant dans l'évaluation des effets médiés par les édulcorants est la condition dans laquelle ces effets sont observés. En effet, certaines études choisissent d'observer l'impact des édulcorants en absence de tous stimuli hyperglycémiques. Sous cette condition, la plupart des résultats obtenus mettent en avant l'innocuité métabolique des édulcorants utilisés (Grotz et al., 2017 ; Nichol et al., 2018). Par contre, de nombreux effets des édulcorants semblent être démasqués lorsque ceux-ci sont testés en condition de stress hyperglycémique, comme c'est le cas après un repas avec une glycémie post-prandiale élevée (Tucker et Tan 2017). Par exemple, lors de notre première étude, la réponse vasculaire des rats ayant consommé du sucralose et de l'Ace-K était altérée en condition hyperglycémique, ce qui n'était pas le cas en normoglycémie (Risdon et al., 2020). Un autre exemple est celui de la réponse des cellules- β dont la sécrétion d'insuline est stimulée par édulcorants

naturelles uniquement en condition hyperglycémique (Philipaert et al., 2017). L'intérêt de travailler en condition normo- ou hyperglycémique a fait l'objet d'une revue publiée en 2017 par Tucker et Tan et d'un commentaire de notre part en réponse à un article démontrant l'innocuité de plusieurs édulcorants sur la glycémie (Tucker et Tan 2017 ; Risdon et al., 2018, Nichol et al., 2018). Ces articles suggèrent que certaines altérations, non visibles en condition basales, ne sont révélées qu'en condition de stress hyperglycémique. En effet, un article récent a pu montrer des différences au niveau des voies de signalisation activées dans un modèle de rongeur nourri avec du sucralose ou du glucose seul ou l'association des deux (Dalenberg et al., 2020).

Une relation effet dose

Malgré les divergences observées dans la littérature, les études observationnelles récentes semblent toutes converger vers la même conclusion selon laquelle il existerait une association positive entre la consommation de boissons édulcorées et l'élévation du risque des maladies circulatoires, de la mortalité CV et de la mortalité toute cause. Ce surrisque apparaît lors de la consommation d'au moins deux boissons édulcorées par jour (Mullee et al., 2019 ; Mossavar-Rahmani et al., 2019). Une méta-analyse récente estime que pour chaque augmentation de consommation de 250mL/jour le risque d'obésité est augmenté de 21%, celui de développer un DT2 est augmenté de 15% et le risque de mortalité toute cause est augmenté de 6% (Qin et al., 2019). Ces études observationnelles suggèrent donc qu'il existe une relation effet dose entre la présence d'un surrisque et la consommation d'édulcorants. Cette hypothèse n'a à notre connaissance jamais été testée par une étude interventionnelle et doit être confirmée.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

CONCLUSION

En conclusion, l'ensemble de ce travail de thèse a permis de caractériser plus spécifiquement les effets d'une consommation chronique d'édulcorants sur la fonction vasculaire, un marqueur précoce du risque CV. En effet, bien que les édulcorants semblent être une stratégie de choix pour remplacer les sucres dans notre alimentation, les études épidémiologiques récentes alertent sur l'augmentation du risque de mortalité CV, associé à la survenue de maladies circulatoires, chez les grands consommateurs d'édulcorants. Nos résultats ont permis de montrer la sensibilité de cette fonction vasculaire en réponse à une consommation chronique de deux édulcorants, le sucralose et l'Ace-K. De manière intéressante, nos travaux montrent également des effets directs spécifiques de chaque molécule sur la balance vasomotrice. Les mécanismes sous-jacents explicatifs restent néanmoins à élucider dans de futures travaux expérimentaux. Enfin, les études de cette thèse ont également mis en évidence l'effet préventif d'un édulcorant de synthèse, le sucralose, sur le développement du risque CV dans un contexte de régime alimentaire obésogène. Ces résultats, au regard de la littérature actuelle, indiquent la nécessité de poursuivre des études expérimentales plus réalistes en utilisant des modèles de consommation de ces édulcorants respectant la dose maximale chez l'homme, permettant ainsi de donner des perspectives cliniques à ces recherches.

PERSPECTIVES

Les données de vasoréactivité *ex vivo* nous ont permis d'observer des effets propres à l'Ace-K et au sucralose sur la vasomotricité artérielle chez le rongeur et microcirculatoire chez l'homme. Nous avons également observé la présence de récepteurs au goût sucré (TAS1Rs) au niveau vasculaire chez le rongeur notamment. Néanmoins, nos données actuelles ne permettent pas de confirmer l'implication de ces récepteurs TAS1Rs dans les effets vasculaires des édulcorants artificiels testés. L'utilisation de modèles génétiques, tels que les souris dont les gènes codant pour les récepteurs du goût sucré ont été invalidés par exemple, permettrait de confirmer nos résultats actuels. De plus, il serait intéressant d'identifier précisément les voies de signalisation impliquant ou non les récepteurs TAS1Rs, au niveau des cellules endothéliales et/ou des CMLV, par lesquelles les édulcorants pourraient moduler la vasomotricité.

Nos travaux sur la base d'une consommation chronique d'un cocktail d'édulcorant Ace-K/sucralose ou sucralose seul présentent des effets différents, notamment sur la composition corporelle et la fonction vasculaire. Nous avons de plus pu démontrer un effet potentiellement préventif du sucralose sur les altérations du contrôle glycémique et de la composition corporelle dans le cadre d'un régime obésogène. Il semble donc nécessaire de reconduire des études permettant d'isoler les effets propres et combinés de ces additifs alimentaires, utilisés à des concentrations physiologiques, sur le développement des facteurs de risque CV et métaboliques. Nos études méritent également d'être prolongées afin de confirmer les résultats obtenus sur nos modèles de consommation à moyen terme (10 à 12 semaines).

Enfin, il s'agira également de vérifier la transposabilité de ces résultats chez l'homme en menant des études cliniques interventionnelles, permettant potentiellement de mieux identifier les conséquences propres directes (sur les cellules du tissu vasculaire) et indirectes (modulation des facteurs de risque CV) de chaque molécule sur la santé cardiométabolique.

BIBLIOGRAPHIE

~ A ~

ADA (2004). Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *J. Am. Diet. Assoc.* *104*, 255–275.

Adeva-Andany, M.M., Martínez-Rodríguez, J., González-Lucán, M., Fernández-Fernández, C., and Castro-Quintela, E. (2019). Insulin resistance is a cardiovascular risk factor in humans. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* *13*, 1449–1455.

Agreste (2019). Betteraves sucrières La France toujours championne de la production de sucre en Europe.

Amitani, M., Asakawa, A., Amitani, H., and Inui, A. (2013). The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front. Neurosci.* *7*.

Andreelli, Jacquier, and Keufer (2006). Propriétés anti-inflammatoires de l'insuline chez les patients en réanimation.

ANSES (2016). L'Anses actualise les repères de consommations alimentaires pour la population française | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.

Antonopoulos, A.S., Margaritis, M., Coutinho, P., Shirodaria, C., Psarros, C., Herdman, L., Sanna, F., Silva, R.D., Petrou, M., Sayeed, R., et al. (2015). Adiponectin as a Link Between Type 2 Diabetes and Vascular NADPH Oxidase Activity in the Human Arterial Wall: The Regulatory Role of Perivascular Adipose Tissue. *Diabetes* *64*, 2207–2219.

Arsenault, B.J., Lamarche, B., and Després, J.-P. (2017). Targeting Overconsumption of Sugar-Sweetened Beverages vs. Overall Poor Diet Quality for Cardiometabolic Diseases Risk Prevention: Place Your Bets! *Nutrients* *9*.

Arzate, A. (2005). Extraction du sucre de betterave. *ACER Cent. Rech. Dév. Transf. Technol. En Agric.*

Asadi, M. (2007). *Beet-Sugar Handbook* | Wiley.

Atlas de la FID (2019). Atlas de la fid 9ème édition et autres ressources.

Azad, M.B., Abou-Setta, A.M., Chauhan, B.F., Rabbani, R., Lys, J., Copstein, L., Mann, A., Jeyaraman, M.M., Reid, A.E., Fiander, M., et al. (2017). Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Can. Med. Assoc. J.* *189*, E929–E939.

~ B ~

Bagger, J.I., Knop, F.K., Lund, A., Vestergaard, H., Holst, J.J., and Vilsbøll, T. (2011). Impaired Regulation of the Incretin Effect in Patients with Type 2 Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, 737–745.

Barazzoni, R., Gortan Cappellari, G., Ragni, M., and Nisoli, E. (2018). Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. *Eat. Weight Disord. - Stud. Anorex. Bulim. Obes.* *23*, 149–157.

Barr, V.A., Malide, D., Zarnowski, M.J., Taylor, S.I., and Cushman, S.W. (1997). Insulin Stimulates Both Leptin Secretion and Production by Rat White Adipose Tissue. *Endocrinology* 138, 4463–4472.

Basta, G., Schmidt, A.M., and De Caterina, R. (2004). Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.* 63, 582–592.

Beltowski, J. (2006). Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. *J. Hypertens.* 24, 789–801.

Benedé-Ubieto, R., Estévez-Vázquez, O., Ramadori, P., Cubero, F.J., and Nevzorova, Y.A. (2020). Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* 13, 439–450.

Bian, X., Chi, L., Gao, B., Tu, P., Ru, H., and Lu, K. (2017). The artificial sweetener acesulfame potassium affects the gut microbiome and body weight gain in CD-1 mice. *PLoS ONE* 12.

Bornemann, V., Werness, S.C., Buslinger, L., and Schiffman, S.S. (2018). Intestinal Metabolism and Bioaccumulation of Sucralose In Adipose Tissue In The Rat. *J. Toxicol. Environ. Health A* 81, 913–923.

Brandes, R.P., and Kreuzer, J. (2005). Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc. Res.* 65, 16–27.

Brown, R.J., Walter, M., and Rother, K.I. (2009). Ingestion of Diet Soda Before a Glucose Load Augments Glucagon-Like Peptide-1 Secretion. *Diabetes Care* 32, 2184–2186.

Brown, R.J., Walter, M., and Rother, K.I. (2012). Effects of diet soda on gut hormones in youths with diabetes. *Diabetes Care* 35, 959–964.

Bryant, C.E., Wasse, L.K., Astbury, N., Nandra, G., and McLaughlin, J.T. (2014). Non-nutritive sweeteners: no class effect on the glycemic or appetite responses to ingested glucose. *Eur. J. Clin. Nutr.* 68, 629–631.

Buisness Wire (2019). Global Zero-Calorie Sweetener Market Projected to Be Worth USD 2.84 Billion by 2021: Technavio | Business Wire.

~ C ~

Campbell, Gebremedhin, Pratt, and Harder (1996). Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. *Circ. Res.* 78, 415–423.

Carr, R.D., Larsen, M.O., Jelic, K., Lindgren, O., Vikman, J., Holst, J.J., Deacon, C.F., and Ahrén, B. (2010). Secretion and Dipeptidyl Peptidase-4-Mediated Metabolism of Incretin Hormones after a Mixed Meal or Glucose Ingestion in Obese Compared to Lean, Nondiabetic Men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 872–878.

Ceddia, R. (2005). Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int. J. Obes.* 29, 1175–1183.

CEDUS (2019). Memo Statistique 2019.

Chatelan, A., Gaillard, P., Kruseman, M., and Keller, A. (2019). Total, Added, and Free Sugar Consumption and Adherence to Guidelines in Switzerland: Results from the First National Nutrition Survey menuCH. *Nutrients* 11, 1117.

Chaudhry, R.M., Garg, A., Abdelfatah, M.M., Duenes, J.A., and Sarr, M.G. (2013). Lack of functionally active sweet taste receptors in the jejunum in vivo in the rat. *J. Surg. Res.* 183, 606–611.

Chazelas, E., Debras, C., Srouf, B., Fezeu, L.K., Julia, C., Hercberg, S., Deschasaux, M., and Touvier, M. (2020). Sugary Drinks, Artificially-Sweetened Beverages, and Cardiovascular Disease in the NutriNet-Santé Cohort. *J. Am. Coll. Cardiol.* 76, 2175–2177.

Chen, H., Montagnani, M., Funahashi, T., Shimomura, I., and Quon, M. (2003). Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 45021–45026.

Chen, J.-G., Ping, N.-N., Liang, D., Li, M.-Y., Mi, Y.-N., Li, S., Cao, L., Cai, Y., and Cao, Y.-X. (2017). The expression of bitter taste receptors in mesenteric, cerebral and omental arteries. *Life Sci.* 170, 16–24.

Combettes-Souverain, M., and Issad, T. (1998). Molecular basis of insulin action.

Cong, W., Wang, R., Cai, H., Daimon, C.M., Scheibye-Knudsen, M., Bohr, V.A., Turkin, R., Wood, W.H., Becker, K.G., Moaddel, R., et al. (2013). Long-Term Artificial Sweetener Acesulfame Potassium Treatment Alters Neurometabolic Functions in C57BL/6J Mice. *PLoS ONE* 8, e70257.

~ D ~

Dagenais, G.R., Leong, D.P., Rangarajan, S., Lanas, F., Lopez-Jaramillo, P., Gupta, R., Diaz, R., Avezum, A., Oliveira, G.B.F., Wielgosz, A., et al. (2020). Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet* 395, 785–794.

Dalenberg, J.R., Patel, B.P., Denis, R., Veldhuizen, M.G., Nakamura, Y., Vinke, P.C., Luquet, S., and Small, D.M. (2020). Short-Term Consumption of Sucralose with, but Not without, Carbohydrate Impairs Neural and Metabolic Sensitivity to Sugar in Humans. *Cell Metab.* 31, 493–502.e7.

Després, Lemieux, Bergeron, Pibarot, Mathieu, Larose Eric, Rodés-Cabau Josep, Bertrand Olivier F., and Poirier Paul (2008). Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1039–1049.

Devos, P. (2008). Effets propres de l'insuline par rapport au contrôle glycémique. *Réanimation* 17, 8–11.

Dong, X.-H., Sun, X., Jiang, G.-J., Chen, A.F., and Xie, H.-H. (2015). Dietary intake of sugar substitutes aggravates cerebral ischemic injury and impairs endothelial progenitor cells in mice. *Stroke* 46, 1714–1718.

D'souza, A.M., Neumann, U.H., Glavas, M.M., and Kieffer, T.J. (2017). The glucoregulatory actions of leptin. *Mol. Metab.* 6, 1052–1065.

Du, X.L., Edelstein, D., Dimmeler, S., Ju, Q., Sui, C., and Brownlee, M. (2001). Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J. Clin. Invest.* 108, 1341–1348.

DuBois, G.E. (2016). Molecular mechanism of sweetness sensation. *Physiol. Behav.* 164, 453–463.

~ F ~

Færch, K., Vistisen, D., Pacini, G., Torekov, S.S., Johansen, N.B., Witte, D.R., Jonsson, A., Pedersen, O., Hansen, T., Lauritzen, T., et al. (2016). Insulin Resistance Is Accompanied by Increased Fasting Glucagon and Delayed Glucagon Suppression in Individuals With Normal and Impaired Glucose Regulation. *Diabetes* 65, 3473–3481.

Fagherazzi, G., Gusto, G., Affret, A., Mancini, F.R., Dow, C., Balkau, B., Clavel-Chapelon, F., Bonnet, F., and Boutron-Ruault, M.-C. (2017). Chronic Consumption of Artificial Sweetener in Packets or Tablets and Type 2 Diabetes Risk: Evidence from the E3N-European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Ann. Nutr. Metab.* 70, 51–58.

Fan, W., Saito, S., and Matsumura, S. (2020). Expression of the Tas1r3 and Pept1 genes in the digestive tract of wagyu cattle. *Transl. Anim. Sci.* 4, 980–985.

Ferron, C. (2011). Lambeau omental extra-abdominal et chirurgie réparatrice du cancer du sein.

Freund, J.R., and Lee, R.J. (2018). Taste receptors in the upper airway. *World J. Otorhinolaryngol. - Head Neck Surg.* 4, 67–76.

Fujita, Y., Wideman, R.D., Speck, M., Asadi, A., King, D.S., Webber, T.D., Haneda, M., and Kieffer, T.J. (2009). Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 296, E473–E479.

~ G ~

Gardner, C., Wylie-Rosett, J., Gidding, S.S., Steffen, L.M., Johnson, R.K., Reader, D., and Lichtenstein, A.H. (2012). Nonnutritive Sweeteners: Current Use and Health Perspectives. *Diabetes Care* 35, 1798–1808.

Giugliano Dario, Marfella Raffaele, Coppola Ludovico, Verrazzo Giovanni, Acampora Rita, Giunta Riccardo, Nappo Francesco, Lucarelli Carmela, and D’Onofrio Felice (1997). Vascular Effects of Acute Hyperglycemia in Humans Are Reversed by L-Arginine. *Circulation* 95, 1783–1790.

Glendinning, J.I., Hart, S.A., Lee, H., Maleh, J., Ortiz, G., Sang Ryu, Y., Sanchez, A., Shelling, S., and Williams, N. (2019). Low calorie sweeteners cause only limited metabolic effects in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*

Grotz, V.L., Pi-Sunyer, X., Porte, D., Roberts, A., and Richard Trout, J. (2017). A 12-week randomized clinical trial investigating the potential for sucralose to affect glucose homeostasis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* RTP 88, 22–33.

~ H ~

Ha, M.-S., Ha, S.-D., Choi, S.-H., and Bae, D.-H. (2013). Assessment of exposure of Korean consumers to acesulfame K and sucralose using a stepwise approach. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 64, 715–723.

Hackett, M., B, A., Ma, X., and Yokose, K. (2014). Sweeteners, High-Intensity - Chemical Economics Handbook (CEH) | IHS Markit.

Hansotia, T., and Drucker, D.J. (2005). GIP and GLP-1 as incretin hormones: lessons from single and double incretin receptor knockout mice. *Regul. Pept.* *128*, 125–134.

Hasegawa, Y., Chen, S.-Y., Sheng, L., Jena, P.K., Kalanetra, K.M., Mills, D.A., Wan, Y.-J.Y., and Slupsky, C.M. (2020). Long-term effects of western diet consumption in male and female mice. *Sci. Rep.* *10*, 14686.

Hattori, Y., Suzuki, M., Hattori, S., and Kasai, K. (2003). Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Diabetologia* *46*, 1543–1549.

Hedrick, V.E., Passaro, E.M., Davy, B.M., You, W., and Zoellner, J.M. (2017). Characterization of Non-Nutritive Sweetener Intake in Rural Southwest Virginian Adults Living in a Health-Disparate Region. *Nutrients* *9*.

Herrera Moro Chao, D., Argmann, C., Van Eijk, M., Boot, R.G., Ottenhoff, R., Van Roomen, C., Foppen, E., Siljee, J.E., Unmehopa, U.A., Kalsbeek, A., et al. (2016). Impact of obesity on taste receptor expression in extra-oral tissues: emphasis on hypothalamus and brainstem. *Sci. Rep.* *6*.

Hess, E.L., Myers, E.A., Swithers, S.E., and Hedrick, V.E. (2018). Associations Between Nonnutritive Sweetener Intake and Metabolic Syndrome in Adults. *J. Am. Coll. Nutr.* *37*, 487–493.

Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., and Kihara, Y. (2009). Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Circ. J.* *73*, 411–418.

Higgins, K.A., and Mattes, R.D. (2019). A randomized controlled trial contrasting the effects of 4 low-calorie sweeteners and sucrose on body weight in adults with overweight or obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* *109*, 1288–1301.

Hink, U., Tsilimingas, N., Wendt, M., and Münzel, T. (2003). Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus: therapeutic implications.

Hu, F.B., and Malik, V.S. (2010). Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: Epidemiologic evidence. *Physiol. Behav.* *100*, 47–54.

Hug, C., Wang, J., Ahmad, N.S., Bogan, J.S., Tsao, T.-S., and Lodish, H.F. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 10308–10313.

Hunter, S.R., Reister, E.J., Cheon, E., and Mattes, R.D. (2019). Low Calorie Sweeteners Differ in Their Physiological Effects in Humans. *Nutrients* *11*.

Huvaere, K., Vandevijvere, S., Hasni, M., Vinkx, C., and Van Locho, J. (2012). Dietary intake of artificial sweeteners by the Belgian population.

~ I ~

Ibi, D., Suzuki, F., and Hiramatsu, M. (2018). Effect of AceK (acesulfame potassium) on brain function under dietary restriction in mice. *Physiol. Behav.* *188*, 291–297.

~ J ~

Jang, H.-J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M.J., Carlson, O.D., Kim, B.-J., Zhou, J., Kim, H.H., Xu, X., Chan, S.L., Juhaszova, M., et al. (2007). Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15069–15074.

~ K ~

Klok, M.D., Jakobsdottir, S., and Drent, M.L. (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obes. Rev.* *8*, 21–34.

Knauf, C., Cani, P.D., Ait-Belgnaoui, A., Benani, A., Dray, C., Cabou, C., Colom, A., Uldry, M., Rastrelli, S., Sabatier, E., et al. (2008). Brain Glucagon-Like Peptide 1 Signaling Controls the Onset of High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance and Reduces Energy Expenditure. *Endocrinology* *149*, 4768–4777.

Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., Hofmann, T., Frank, O., Behrens, M., Lewtschenko, T., Slack, J.P., Ward, C.D., and Meyerhof, W. (2004). Bitter Taste Receptors for Saccharin and Acesulfame K. *J. Neurosci.* *24*, 10260–10265.

~ L ~

Lana, A., Rodríguez-Artalejo, F., and Lopez-Garcia, E. (2014). Consumption of Sugar-Sweetened Beverages Is Positively Related to Insulin Resistance and Higher Plasma Leptin Concentrations in Men and Nonoverweight Women. *J. Nutr.* *144*, 1099–1105.

Lasconi, C., Pifferi, S., Hernandez-Clavijo, A., Merigo, F., Cecchini, M.P., Gonzalez-Velandia, K.Y., Agostinelli, E., Sbarbati, A., and Menini, A. (2019). Bitter tastants and artificial sweeteners activate a subset of epithelial cells in acute tissue slices of the rat trachea. *Sci. Rep.* *9*.

Lastra, G., Manrique, C.M., and Hayden, M.R. (2006). The Role of β -Cell Dysfunction in the Cardiometabolic Syndrome. *J. Cardiometab. Syndr.* *1*, 41–46.

Laviada-Molina, H., Molina-Segui, F., Pérez-Gaxiola, G., Cuello-García, C., Arjona-Villicaña, R., Espinosa-Marrón, A., and Martinez-Portilla, R.J. (2020). Effects of nonnutritive sweeteners on body weight and BMI in diverse clinical contexts: Systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.*

Lee, A.A., and Owyang, C. (2017). Sugars, Sweet Taste Receptors, and Brain Responses. *Nutrients* *9*.

Leech, C.J., and Faber, J.E. (1996). Different alpha-adrenoceptor subtypes mediate constriction of arterioles and venules. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* *270*, H710–H722.

Lertrit, A., Srimachai, S., Saetung, S., Chanprasertyothin, S., Chailurkit, L.-O., Areevut, C., Katekao, P., Ongphiphadhanakul, B., and Sriphrapadang, C. (2018). Effects of sucralose on insulin and glucagon-like peptide-1 secretion in healthy subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* *55–56*, 125–130.

Li, D., O'Brien, J.W., Tschärke, B.J., Choi, P.M., Ahmed, F., Thompson, J., Mueller, J.F., Sun, H., and Thomas, K.V. (2020). Trends in artificial sweetener consumption: A 7-year wastewater-based epidemiology study in Queensland, Australia. *Sci. Total Environ.* 754, 142438.

Lian, Y., Xie, L., Liu, Y., and Tang, F. (2019). Metabolic-related markers and inflammatory factors as predictors of dyslipidemia among urban Han Chinese adults. *Lipids Health Dis.* 18, 167.

Lim, H.J., Xue, H., and Wang, Y. (2020). Global Trends in Obesity. In *Handbook of Eating and Drinking: Interdisciplinary Perspectives*, H.L. Meiselman, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1217–1235.

Loader, J., Meziat, C., Watts, R., Lorenzen, C., Sigauco-Roussel, D., Stewart, S., Reboul, C., Meyer, G., and Walther, G. (2017). Effects of Sugar-Sweetened Beverage Consumption on Microvascular and Macrovascular Function in a Healthy Population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 1250–1260.

Lu, P., Zhang, C.-H., Lifshitz, L.M., and ZhuGe, R. (2017). Extraoral bitter taste receptors in health and disease. *J. Gen. Physiol.* 149, 181–197.

~ M ~

Mace, O.J., Affleck, J., Patel, N., and Kellett, G.L. (2007). Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2: Sweet taste receptors regulate apical GLUT2. *J. Physiol.* 582, 379–392.

Magnuson, B.A., Carakostas, M.C., Moore, N.H., Poulos, S.P., and Renwick, A.G. (2016). Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutr. Rev.* 74, 670–689.

Mah, E., and Bruno, R.S. (2012). Postprandial hyperglycemia on vascular endothelial function: mechanisms and consequences. *Nutr. Res. N. Y.* 32, 727–740.

Mah, E., Noh, S.K., Ballard, K.D., Matos, M.E., Volek, J.S., and Bruno, R.S. (2011). Postprandial hyperglycemia impairs vascular endothelial function in healthy men by inducing lipid peroxidation and increasing asymmetric dimethylarginine:arginine. *J. Nutr.* 141, 1961–1968.

Maillet, É.L. (2011). Récepteurs gustatifs des molécules sucrantes et antisucrantes - Un rôle métabolique insoupçonné. *médecine/sciences* 27, 177–182.

Mäkimattila, Virkamäki, Groop, Cockcroft, Utriainen, Fagerudd, and Yki-Järvinen (1996). Chronic Hyperglycemia Impairs Endothelial Function and Insulin Sensitivity Via Different Mechanisms in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Circulation* 94, 1276–1282.

Malbert, C.-H., Horowitz, M., and Young, R.L. (2019). Low-calorie sweeteners augment tissue-specific insulin sensitivity in a large animal model of obesity. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 46, 2380–2391.

Malik, V.S., Popkin, B.M., Bray, G.A., Després, J.-P., and Hu, F.B. (2010). Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation* 121, 1356–1364.

Malik, V.S., Li, Y., Pan, A., De Koning, L., Schernhammer, E., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2019). Long-Term Consumption of Sugar-Sweetened and Artificially Sweetened Beverages and Risk of Mortality in US Adults. *Circulation*.

Mangmool, S., Denkaew, T., Parichatikanond, W., and Kurose, H. (2017). β -Adrenergic Receptor and Insulin Resistance in the Heart. *Biomol. Ther.* 25, 44.

Manson, M., Säfholm, J., Al-Ameri, M., Bergman, P., Orre, A., K, S., A, J., Se, D., and M, A. (2014). Bitter taste receptor agonists mediate relaxation of human and rodent vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 302–311.

Margolskee, R.F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K.S.H., Ilegems, E., Daly, K., Maillet, E.L., Ninomiya, Y., Mosinger, B., and Shirazi-Beechey, S.P. (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15075–15080.

Mari, A., Bagger, J.I., Ferrannini, E., Holst, J.J., Knop, F.K., and Vilsbøll, T. (2013). Mechanisms of the Incretin Effect in Subjects with Normal Glucose Tolerance and Patients with Type 2 Diabetes. *PLOS ONE* **8**, e73154.

Marriott, B.P., Olsho, L., Hadden, L., and Connor, P. (2010). Intake of added sugars and selected nutrients in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2003-2006. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **50**, 228–258.

Masubuchi, Y., Nakagawa, Y., Ma, J., Sasaki, T., Kitamura, T., Yamamoto, Y., Kurose, H., Kojima, I., and Shibata, H. (2013). A Novel Regulatory Function of Sweet Taste-Sensing Receptor in Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Cells. *PLoS ONE* **8**.

Masuda, K., Koizumi, A., Nakajima, K., Tanaka, T., Abe, K., Misaka, T., and Ishiguro, M. (2012). Characterization of the Modes of Binding between Human Sweet Taste Receptor and Low-Molecular-Weight Sweet Compounds. *PLOS ONE* **7**, e35380.

Memon, M.Q., Simpson, E.J., and Macdonald, I.A. (2014). Effect of fructose and sucralose on flow-mediated vasodilatation in healthy, white European males. *JPM J. Pak. Med. Assoc.* **64**, 743–747.

Miller, P.E., and Perez, V. (2014). Low-calorie sweeteners and body weight and composition: a meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **100**, 765–777.

Mossavar-Rahmani Yasmin, Kamensky Victor, Manson JoAnn E., Silver Brian, Rapp Stephen R., Haring Bernhard, Beresford Shirley A.A., Snetselaar Linda, and Wassertheil-Smoller Sylvia (2019). Artificially Sweetened Beverages and Stroke, Coronary Heart Disease, and All-Cause Mortality in the Women's Health Initiative. *Stroke* **50**, 555–562.

Mullee, A., Romaguera, D., Pearson-Stuttard, J., Viallon, V., Stepien, M., Freisling, H., Fagherazzi, G., Mancini, F.R., Boutron-Ruault, M.-C., Kühn, T., et al. (2019). Association Between Soft Drink Consumption and Mortality in 10 European Countries. *JAMA Intern. Med.* **179**, 1479–1490.

Muscelli, E., Mari, A., Natali, A., Astiarraga, B.D., Camastra, S., Frascerra, S., Holst, J.J., and Ferrannini, E. (2006). Impact of incretin hormones on β -cell function in subjects with normal or impaired glucose tolerance. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **291**, E1144–E1150.

~ N ~

Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Yamada, S., Hara, A., Mogami, H., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Shigemura, N., Ninomiya, Y., and Kojima, I. (2009). Sweet Taste Receptor Expressed in Pancreatic β -Cells Activates the Calcium and Cyclic AMP Signaling Systems and Stimulates Insulin Secretion. *PLoS ONE* **4**, e5106.

Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Mogami, H., Lohse, M., Ninomiya, Y., and Kojima, I. (2013). Multimodal function of the sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells: generation of diverse patterns of intracellular signals by sweet agonists. *Endocr. J.* *60*, 1191–1206.

Narain, A., Kwok, C.S., and Mamas, M.A. (2016). Soft drinks and sweetened beverages and the risk of cardiovascular disease and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Clin. Pract.* *70*, 791–805.

Nauck, M.A., Homberger, E., Siegel, E.G., Allen, R.C., Eaton, R.P., Ebert, R., and Creutzfeldt, W. (1986). Incretin Effects of Increasing Glucose Loads in Man Calculated from Venous Insulin and C-Peptide Responses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *63*, 492–498.

NCD (2016). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *The Lancet* *387*, 1377–1396.

Nelson, G., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J.P., and Zuker, C.S. (2001). Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell* *106*, 381–390.

Nichol, A.D., Holle, M.J., and An, R. (2018). Glycemic impact of non-nutritive sweeteners: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur. J. Clin. Nutr.* *72*, 796–804.

Nie, Y., Vignes, S., Hobbs, J.R., Conn, G.L., and Munger, S.D. (2005). Distinct Contributions of T1R2 and T1R3 Taste Receptor Subunits to the Detection of Sweet Stimuli. *Curr. Biol.* *15*, 1948–1952.

Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.-P., et al. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* *404*, 787–790.

~ O ~

O'Brien, P., Hewett, R., and Corpe, C. (2018). Sugar sensor genes in the murine gastrointestinal tract display a cephalocaudal axis of expression and a diurnal rhythm. *Physiol. Genomics* *50*, 448–458.

OECD (2017). OECD Health Statistics 2017 - OECD.

Ohtsu, Y., Nakagawa, Y., Nagasawa, M., Takeda, S., Arakawa, H., and Kojima, I. (2014). Diverse signaling systems activated by the sweet taste receptor in human GLP-1-secreting cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* *394*, 70–79.

Olivier-Van Stichelen, S., Rother, K.I., and Hanover, J.A. (2019). Maternal Exposure to Non-nutritive Sweeteners Impacts Progeny's Metabolism and Microbiome. *Front. Microbiol.* *10*.

Opinto, G., Natalicchio, A., and Marchetti, P. (2013). Physiology of incretins and loss of incretin effect in type 2 diabetes and obesity. *Arch. Physiol. Biochem.* *119*, 170–178.

OQALI (2012). OQALI - Observatoire de la Qualité de l'Alimentation - Études transversales.

OQALI (2019). OQALI - Observatoire de la Qualité de l'Alimentation - Additifs.

Ouedraogo, R., Gong, Y., Berzins, B., Wu, X., Mahadev, K., Hough, K., Chan, L., Goldstein, B.J., and Scalia, R. (2007). Adiponectin deficiency increases leukocyte-endothelium interactions via upregulation of endothelial cell adhesion molecules in vivo. *J. Clin. Invest.* *117*, 1718–1726.

~ P ~

- Pacheco, Lacey, Martinez, Lemus, Araneta Maria Rosario G., Sears, Talavera, and Anderson (2020). Sugar-Sweetened Beverage Intake and Cardiovascular Disease Risk in the California Teachers Study. *J. Am. Heart Assoc.* 9, e014883.
- Pandit, R., Beerens, S., and Adan, R. a. H. (2017). Role of leptin in energy expenditure: the hypothalamic perspective. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 312, R938–R947.
- Pang, M.D., Goossens, G.H., and Blaak, E.E. (2021). The Impact of Artificial Sweeteners on Body Weight Control and Glucose Homeostasis. *Front. Nutr.* 7.
- Patti, M., and Kahn, C. (1998). The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action.
- Pepino, M.Y. (2015). Metabolic effects of non-nutritive sweeteners. *Physiol. Behav.* 152, 450–455.
- Pepino, M.Y. (2018). The not-so-sweet effects of sucralose on blood sugar control. *Am. J. Clin. Nutr.* 108, 431–432.
- Pepino, M.Y., Tiemann, C.D., Patterson, B.W., Wice, B.M., and Klein, S. (2013). Sucralose Affects Glycemic and Hormonal Responses to an Oral Glucose Load. *Diabetes Care* 36, 2530–2535.
- Philippaert, K., Pironet, A., Mesuere, M., Sones, W., Vermeiren, L., Kerselaers, S., Pinto, S., Segal, A., Antoine, N., Gysemans, C., et al. (2017). Steviol glycosides enhance pancreatic beta-cell function and taste sensation by potentiation of TRPM5 channel activity. *Nat. Commun.* 8, 1–16.
- Piché, Tchernof, and Després (2020). Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ. Res.* 126, 1477–1500.
- Plows, J.F., Morton-Jones, J., Bridge-Comer, P.E., Ponnampalam, A., Stanley, J.L., Vickers, M.H., and Reynolds, C.M. (2020). Consumption of the Artificial Sweetener Acesulfame Potassium throughout Pregnancy Induces Glucose Intolerance and Adipose Tissue Dysfunction in Mice. *J. Nutr.* 150, 1773–1781.
- Poher, A.-L., Tschöp, M.H., and Müller, T.D. (2018). Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides* 100, 236–242.
- Potenza, M.A., Addabbo, F., and Montagnani, M. (2009). Vascular actions of insulin with implications for endothelial dysfunction. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* 297, E568–E577.
- Poti, J.M., Braga, B., and Qin, B. (2017). Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health – Processing or Nutrient Content? *Curr. Obes. Rep.* 6, 420–431.
- Procopio, C., Andreozzi, F., Laratta, E., Cassese, A., Beguinot, F., Arturi, F., Hribal, M.L., Perticone, F., and Sesti, G. (2009). Leptin-Stimulated Endothelial Nitric-Oxide Synthase via an Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase/Akt Signaling Pathway Is Attenuated by Interaction with C-Reactive Protein. *Endocrinology* 150, 3584–3593.
- Pronin, A.N., Xu, H., Tang, H., Zhang, L., Li, Q., and Li, X. (2007). Specific Alleles of Bitter Receptor Genes Influence Human Sensitivity to the Bitterness of Aloin and Saccharin. *Curr. Biol.* 17, 1403–1408.

~ Q ~

Qin, P., Li, Q., Zhao, Y., Chen, Q., Sun, X., Liu, Y., Li, H., Wang, T., Chen, X., Zhou, Q., et al. (2020). Sugar and artificially sweetened beverages and risk of obesity, type 2 diabetes mellitus, hypertension, and all-cause mortality: a dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Epidemiol.* 35, 655–671.

Quinlan, M.E., and Jenner, M.R. (1990). Analysis and stability of the sweetener sucralose in beverages.

~ R ~

Raben, A., Vasilaras, T.H., Møller, A.C., and Astrup, A. (2002). Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 721–729.

Rajan, S., Dickson, L.M., Mathew, E., Orr, C.M.O., Ellenbroek, J.H., Philipson, L.H., and Wicksteed, B. (2015). Chronic hyperglycemia downregulates GLP-1 receptor signaling in pancreatic β -cells via protein kinase A. *Mol. Metab.* 4, 265–276.

Recasens, M., Ricart, W., and Fernández-Real, J. (2004). [Obesity and inflammation].

Renwick, A.G. (1986). The metabolism of intense sweeteners. *Xenobiotica* 16, 1057–1071.

Reyes, M.M., Gravina, S.A., and Hayes, J.E. (2019). Evaluation of Sweetener Synergy in Humans by Isobole Analyses. *Chem. Senses* 44, 571–582.

Rezvani, R., Cianflone, K., McGahan, J.P., Berglund, L., Bremer, A.A., Keim, N.L., Griffen, S.C., Havel, P.J., and Stanhope, K.L. (2013). Effects of sugar-sweetened beverages on plasma acylation stimulating protein, leptin and adiponectin: Relationships with Metabolic Outcomes. *Obesity* 21, 2471–2480.

Risdon, S., Roustit, M., Meyer, G., and Walther, G. (2018). Is fasting blood glucose a reliable parameter to investigate the effect of non-nutritive sweeteners on glucose metabolism? *Eur J Clin Nutr.*

Risdon, S., Meyer, G., Marziou, A., Riva, C., Roustit, M., and Walther, G. (2020). Artificial sweeteners impair endothelial vascular reactivity: Preliminary results in rodents. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 30, 843–846.

Roberts, A., Renwick, A.G., Sims, J., and Snodin, D.J. (2000). Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. *Food Chem. Toxicol.* 38, 31–41.

Rogers, P.J., Hogenkamp, P.S., de Graaf, C., Higgs, S., Lluch, A., Ness, A.R., Penfold, C., Perry, R., Putz, P., Yeomans, M.R., et al. (2016). Does low-energy sweetener consumption affect energy intake and body weight? A systematic review, including meta-analyses, of the evidence from human and animal studies. *Int. J. Obes.* 2016 40, 381–394.

Rom, S., Heldt, N.A., Gajghate, S., Seliga, A., Reichenbach, N.L., and Persidsky, Y. (2020). Hyperglycemia and advanced glycation end products disrupt BBB and promote occludin and claudin-5 protein secretion on extracellular microvesicles. *Sci. Rep.* 10, 1–14.

Romo-Romo, A., Aguilar-Salinas, C.A., Brito-Córdova, G.X., Gómez-Díaz, R.A., and Almeda-Valdes, P. (2018). Sucralose decreases insulin sensitivity in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* *108*, 485–491.

Rossi, M., Maurizio, S., and Carpi, A. (2005). Skin blood flowmotion response to insulin iontophoresis in normal subjects. *Microvasc. Res.* *70*, 17–22.

Rother, K.I., Sylvestsky, A.C., Walter, P.J., Garraffo, H.M., and Fields, D.A. (2018). Pharmacokinetics of Sucralose and Acesulfame-Potassium in Breast Milk Following Ingestion of Diet Soda. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* *66*, 466–470.

Ruanpeng, D., Thongprayoon, C., Cheungpasitporn, W., and Harindhanavudhi, T. (2017). Sugar and artificially sweetened beverages linked to obesity: a systematic review and meta-analysis. *QJM Int. J. Med.* *110*, 513–520.

de Ruyter, J.C., Olthof, M.R., Seidell, J.C., and Katan, M.B. (2012). A trial of sugar-free or sugar-sweetened beverages and body weight in children. *N. Engl. J. Med.* *367*, 1397–1406.

~ S ~

Sáinz, N., Barrenetxe, J., Moreno-Aliaga, M.J., and Martínez, J.A. (2015). Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism* *64*, 35–46.

Saklayen, M.G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr. Hypertens. Rep.* *20*.

Sánchez-Muñoz, F., García-Macedo, R., Alarcón-Aguilar, F., and Cruz, M. (2005). [Adipocitokines, adipose tissue and its relationship with immune system cells].

Sánchez-Tapia, M., Martínez-Medina, J., Tovar, A.R., and Torres, N. (2019). Natural and Artificial Sweeteners and High Fat Diet Modify Differential Taste Receptors, Insulin, and TLR4-Mediated Inflammatory Pathways in Adipose Tissues of Rats. *Nutrients* *11*.

Santa-Cruz Calvo, S., and Egan, J.M. (2015). The endocrinology of taste receptors. *Nat. Rev. Endocrinol.* *11*, 213–227.

Schiffman, S.S., Booth, B.J., Carr, B.T., Losee, M.L., Sattely-Miller, E.A., and Graham, B.G. (1995). Investigation of synergism in binary mixtures of sweeteners. *Brain Res. Bull.* *38*, 105–120.

Schjoldager, B.T.G., Mortensen, P.E., Christiansen, J., Ørskov, C., and Holst, J.J. (1989). GLP-1 (glucagon-like peptide 1) and truncated GLP-1, fragments of human proglucagon, inhibit gastric acid secretion in humans. *Dig. Dis. Sci.* *34*, 703–708.

Schulz, E., Gori, T., and Münzel, T. (2011). Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens. Res.* *34*, 665–673.

Sclafani, A., Touzani, K., and Bodnar, R.J. (2011). Dopamine and Learned Food Preferences. *Physiol. Behav.* *104*, 64–68.

Serné, E.H., IJzerman, R.G., Gans, R.O.B., Nijveldt, R., Vries, G. de, Evertz, R., Donker, A.J.M., and Stehouwer, C.D.A. (2002). Direct Evidence for Insulin-Induced Capillary Recruitment in Skin of Healthy Subjects During Physiological Hyperinsulinemia. *Diabetes* *51*, 1515–1522.

Sigoillot, M., Laffitte, A., Neiers, F., and Briand, L. (2015). Les inhibiteurs du goût sucré : perspectives thérapeutiques. *Cah. Nutr. Diététique* 50, 252–261.

Simon, B.R., Parlee, S.D., Learman, B.S., Mori, H., Scheller, E.L., Cawthorn, W.P., Ning, X., Gallagher, K., Tyrberg, B., Assadi-Porter, F.M., et al. (2013). Artificial Sweeteners Stimulate Adipogenesis and Suppress Lipolysis Independently of Sweet Taste Receptors. *J. Biol. Chem.* 288, 32475–32489.

Singh, Hoffmann, Wolk, Shamsuzzaman, and Somers (2007). Leptin Induces C-Reactive Protein Expression in Vascular Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, e302–e307.

Stas, S.N., El-Atat, F.A., and Sowers, J.R. (2004). Pathogenesis of Hypertension in Diabetes. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 5, 221–225.

Steinert, R.E., Frey, F., Töpfer, A., Drewe, J., and Beglinger, C. (2011). Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. *Br. J. Nutr.* 105, 1320–1328.

Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaïss, C.A., Maza, O., Israeli, D., Zmora, N., Gilad, S., Weinberger, A., et al. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* 514, 181–186.

Suzuki, K., Olah, G., Modis, K., Coletta, C., Kulp, G., Gerö, D., Szoleczky, P., Chang, T., Zhou, Z., Wu, L., et al. (2011). Hydrogen sulfide replacement therapy protects the vascular endothelium in hyperglycemia by preserving mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13829–13834.

Sylvetsky, A.C., and Rother, K.I. (2016). Trends in the Consumption of Low-Calorie Sweeteners. *Physiol. Behav.* 164, 446–450.

Sylvetsky, A.C., Welsh, J.A., Brown, R.J., and Vos, M.B. (2012). Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* 96, 640–646.

Sylvetsky, A.C., Gardner, A.L., Bauman, V., Blau, J.E., Garraffo, H.M., Walter, P.J., and Rother, K.I. (2015). Non-nutritive sweeteners in breast milk. *J. Toxicol. Environ. Health A* 78, 1029–1032.

Sylvetsky, A.C., Brown, R.J., Blau, J.E., Walter, M., and Rother, K.I. (2016). Hormonal responses to non-nutritive sweeteners in water and diet soda. *Nutr. Metab.* 13, 71.

Sylvetsky, A.C., Bauman, V., Blau, J.E., Garraffo, H.M., Walter, P.J., and Rother, K.I. (2017). Plasma concentrations of sucralose in children and adults. *Toxicol. Environ. Chem.* 99, 535–542.

~ T ~

Tan, K.C.B., Xu, A., Chow, W.S., Lam, M.C.W., Ai, V.H.G., Tam, S.C.F., and Lam, K.S.L. (2004). Hypoadiponectinemia Is Associated with Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 765–769.

Toews, I., Lohner, S., Gaudry, D.K. de, Sommer, H., and Meerpohl, J.J. (2019). Association between intake of non-sugar sweeteners and health outcomes: systematic review and meta-analyses of randomised and non-randomised controlled trials and observational studies. *BMJ* 364.

Torregrossa, A.-M., Loney, G.C., Smith, J.C., and Eckel, L.A. (2015). Examination of the perception of sweet- and bitter-like taste qualities in sucralose preferring and avoiding rats. *Physiol. Behav.* 140, 96–103.

Tsai, M., Asakawa, A., Amitani, H., and Inui, A. (2012). Stimulation of leptin secretion by insulin. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 16, S543–S548.

Tucker, R.M., and Tan, S.-Y. (2017). Do non-nutritive sweeteners influence acute glucose homeostasis in humans? A systematic review. *Physiol. Behav.* 182, 17–26.

Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M.B., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., et al. (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379, 69–72.

Tziomalos, K., Athyros, V.G., Karagiannis, A., and Mikhailidis, D.P. (2010). Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: Prevalence, pathogenesis and management. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 20, 140–146.

~ U ~

Uebanso, T., Ohnishi, A., Kitayama, R., Yoshimoto, A., Nakahashi, M., Shimohata, T., Mawatari, K., and Takahashi, A. (2017). Effects of Low-Dose Non-Caloric Sweetener Consumption on Gut Microbiota in Mice. *Nutrients* 9.

Uhlenhaut, N., and Treier, M. (2011). Forkhead transcription factors in ovarian function.

~ V ~

Vitau, J. (2009). Le sucre. *Hors Collect.* 133–140.

~ W ~

Walker, R. International Programme on Chemical Safety. Acesulfame Potassium.

Walther, Obert Philippe, Dutheil Frédéric, Chapier Robert, Lesourd Bruno, Naughton Geraldine, Courteix Daniel, and Vinet Agnès (2015). Metabolic Syndrome Individuals With and Without Type 2 Diabetes Mellitus Present Generalized Vascular Dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 1022–1029.

Webb, M.C., Chong, D., and Bawa, S. (2020). Consumption patterns of nonnutritive sweeteners among university students at a Caribbean institution. *J. Am. Coll. Health* 0, 1–6.

Wen, Y., Skidmore, J.C., Porter-Turner, M.M., Rea, C.A., Khokher, M.A., and Singh, B.M. (2002). Relationship of glycation, antioxidant status and oxidative stress to vascular endothelial damage in diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 4, 305–308.

Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R.E., and Tataranni, P.A. (2001). Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association with Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1930–1935.

WHO (2002). WHO | Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases.

WHO (2015). Guideline: Sugars Intake for Adults and Children.

WHO (2019). Cardiovascular diseases.

Wood, S.G., John, B.A., and Hawkins, D.R. (2000). The pharmacokinetics and metabolism of sucralose in the dog. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 38 *Suppl* 2, S99-106.

~ Y ~

Yin, J., Zhu, Y., Malik, V., Li, X., Peng, X., Zhang, F.F., Shan, Z., and Liu, L. (2020a). Intake of Sugar-Sweetened and Low-Calorie Sweetened Beverages and Risk of Cardiovascular Disease: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Adv. Nutr.*

Yin, K., L, Z., Fan, G., Ren, J., Zhang, L., and Pan, S. (2020b). Effects of different sweeteners on behavior and neurotransmitters release in mice.

Young, R.L., Isaacs, N.J., Schober, G., Wu, T., Cvijanovic, N., Pezos, N., Bound, M., Keating, D., Rayner, C., and Horowitz, M. (2017). Impact of artificial sweeteners on glycaemic control in healthy humans. *Diabetologia* 60, S91.

Yusuf, S., Joseph, P., Rangarajan, S., Islam, S., Mente, A., Hystad, P., Brauer, M., Kutty, V.R., Gupta, R., Wielgosz, A., et al. (2020). Modifiable risk factors, cardiovascular disease, and mortality in 155 722 individuals from 21 high-income, middle-income, and low-income countries (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet* 395, 795–808.

~ Z ~

Zhang, G.-H., Chen, M.-L., Liu, S.-S., Zhan, Y.-H., Quan, Y., Qin, Y.-M., and Deng, S.-P. (2011). Effects of Mother's Dietary Exposure to Acesulfame-K in Pregnancy or Lactation on the Adult Offspring's Sweet Preference. *Chem. Senses* 36, 763–770.

Zheng, Y., and Sarr, M.G. (2013). Effect of the Artificial Sweetener, Acesulfame Potassium, a Sweet Taste Receptor Agonist, on Glucose Uptake in Small Intestinal Cell Lines. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* 17, 153–158.

Zhu, W., Cheng, K.K.Y., Vanhoutte, P.M., Lam, K.S.L., and Xu, A. (2008). Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention. *Clin. Sci.* 114, 361–374.

Zieman, Melenovsky, and Kass (2005). Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial Stiffness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 932–943.

Zuberbuhler, and Bohr (1965). Responses of Coronary Smooth Muscle to Catecholamines. *Circ. Res.* 16, 431–440.

ANNEXES



Is fasting blood glucose a reliable parameter to investigate the effect of non-nutritive sweeteners on glucose metabolism?

Sydney Risdon¹ · Matthieu Roustit^{2,3} · Gregory Meyer¹ · Guillaume Walther¹

Received: 10 September 2018 / Revised: 25 October 2018 / Accepted: 4 November 2018
© Springer Nature Limited 2018

In the October issue of the *European Journal of Clinical Nutrition*, Nichol et al. [1] present results of a meta-analysis assessing the glycemic impact of non-nutritive sweeteners (NNS), molecules largely used to sweeten food and beverage preparations. With the dramatic increase in their consumption, this question is of interest, in order to evaluate the potential effect of NNS on human health, especially metabolic and cardiovascular risk factors. In this context, the effect of NNS on glucose metabolism is often discussed in the literature, as well as by international health agencies, as several epidemiological studies have revealed association between chronic NNS consumption and an increase in cardiometabolic disease prevalence.

The authors did an extensive search of the literature and report on findings from 29 studies with 741 subjects that measured the glycemic impact of NNS. The authors focused specifically on studies comparing the acute effects of four NNS (aspartame, saccharin, steviolosides, and sucralose) on several biological parameters with a focus on fasting blood glucose level. Considering any of the four NNS mentioned, the meta-analysis reported no increase in fasting glucose blood level and described a gradual decline over 210 min after NNS ingestion. Meta-regressions have further shown that age, weight, and diabetic status of subjects significantly

influence change in blood glucose following NNS consumption.

However, two key caveats must be considered regarding these findings. Nichol et al. [1] reviewed the impact of acute NNS consumption on glucose metabolism, focusing on the NNS beverage consumption in a fasting state. Although it is assumed that the highest prevalence of NNS is found in beverages, the addition of NNS in other caloric sources (e.g., food and beverages containing fat, carbohydrates, or added sugar) represents a major clinical issue. In fact, there is a rise in food products that contain both carbohydrates, mainly added sugars, and NNS. Furthermore, it is increasingly assumed that the metabolic effects of NNS are highly dependent on food matrix or type [2], and that besides the acute metabolic effects due to various food type interactions, NNS consumption elicits a significant increase in food intake. For these reasons, results assessing the effect of NNS consumption alone may be less relevant from a clinical point of view. Indeed, several studies reported that acute NNS administration without a carbohydrate load or standardized meal do not differ from water consumption regarding the effects on blood glucose [2, 3]. However, recent studies have reported higher glycemic and hormonal responses to an oral glucose load after sucralose ingestion in obese people compared with their normal-weight counterparts [4]. These findings support the notion that some NNS may not be metabolically inert and could have significant physiological effects depending on the patient's characteristics [5]. This is of importance, as obese or diabetic patients are known to consume more NNS than normal-weight subjects, in order to manage blood glucose. Thus, further studies are needed to better understand the effects of NNS consumption as a preload model on glucose metabolism in interaction with different food matrix or types. These studies should be specific to patients presenting cardiovascular or metabolic conditions and monitor the daily NNS consumption of the participants (e.g., occasional or regular).

The second caveat concerned the glycemic variability, defined as glucose fluctuations around a mean and

Correspondence to the article: "Glycemic impact of non-nutritive sweeteners: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials" Nichol AD, Holle MJ, An R. *Eur J Clin Nutr*. 2018 May 15

✉ Guillaume Walther
guillaume.walther@univ-avignon.fr

¹ Avignon University, LAPEC EA4278, F-84000 Avignon, France

² Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1042, 38000 Grenoble, France

³ Department of Clinical Pharmacology, Grenoble Alpes University Hospital, Inserm CIC1406, 38000 Grenoble, France

considered as a key determinant of cardiovascular damage [6]. Indeed, high fluctuation in post-prandial glycemia has been clearly identified as a major risk factor in the development of cardiometabolic diseases. Nichol et al. [1] highlighted the absence of blood glycemia increase after NNS consumption compared with baseline. However, it is important to mention that the results also demonstrated a significant decrease in blood glucose between 180 and 210 min after NNS consumption. In consequence, this meta-analysis demonstrates that glycemic variability and metabolism is impacted by NNS consumption, as previously discussed [3, 7]. In addition, the authors also reported no differences between NNS type for any of the time intervals included in the meta-analysis. However, we cannot conclude that all NNS types have the same effects on blood glucose, as the level of heterogeneity is not presented in detail and as some studies had small sample sizes. In this context, further studies are needed not only in both healthy subjects and those with cardiometabolic disease to assess glycemic variability with up-to-date methods [8] but also to specifically address differences in NNS type, as these compounds could present disparity in their metabolic effects.

Besides these clinical observations, more and more studies describe the different mechanisms underlying the interaction between NNS and glucose metabolism. The first mechanism implicates the sweet taste receptors T1R2/T1R3, which have been described in different locations, mainly in the tongue and the gut [9]. After their activation by sugar intake and further central nervous system signals, glucose transporters translocate to the enterocyte apical membrane, allowing glucose transport from the intestinal lumen to the systemic circulation. At the same time, to regulate the further increase in blood glucose level, insulin and gut hormones such as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) are secreted [10]. Data obtained in clinical studies demonstrated that NNS consumption increases GLP-1 secretion and causes insulin hypersecretion, which are known to be associated with the development of obesity and type 2 diabetes [10]. Moreover, it appears mandatory to evaluate, in association with the blood glucose level, insulin and gut hormones secretion in cases of acute NNS consumption associated with a sugar load or other foods, as a major issue in chronic hyperglycemia is the progressive loss of insulin receptor sensitivity, essential in glucose homeostasis. The use of hyperglycemic clamps could be of great interest to assess insulin secretion after acute NNS consumption in healthy humans and subjects with cardiometabolic disease.

To conclude, the results of Nichol et al. [1] suggest that acute NNS consumption does not increase blood glucose

level in the fasting state. However, we cannot be sure that NNS has a neutral effect on blood glucose. Indeed, it would be of major interest to assess these parameters in subjects who consume NNS in association with other sources of food (sugar, fat), mimicking a real life meal. Furthermore, the interpretation of blood glucose level consistency after acute NNS consumption should be taken with caution, as some parameters (such as gut hormone secretion) are impacted and associated with cardiovascular diseases regardless of blood glucose level and its variations. Further studies are needed to evaluate insulin sensitivity and secretion in these conditions using hyperinsulinemic euglycemic and hyperglycemic clamps, respectively. Finally, longer-term studies are needed to provide a better understanding of the effect of repeated NNS consumption on blood glucose control, stating which class of NNS is involved, as the majority of the available information to date are from crossover studies with a single load of NNS.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Nichol AD, Holle MJ, An R. Glycemic impact of non-nutritive sweeteners: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Clin Nutr.* 2018;72:796–804.
2. Chan CB, Hashemi Z, Subhan FB. The impact of low and non-caloric sweeteners on glucose absorption, incretin secretion, and glucose tolerance. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2017;42:793–801.
3. Tucker RM, Tan S-Y. Do non-nutritive sweeteners influence acute glucose homeostasis in humans? A systematic review. *Physiol Behav.* 2017;182:17–26.
4. Pepino MY, Tiemann CD, Patterson BW, Wice BM, Klein S. Sucralose affects glycemic and hormonal responses to an oral glucose load. *Diabetes Care.* 2013;36:2530–5.
5. Suez J, Korem T, Zilberman-Schapira G, Segal E, Elinav E. Non-caloric artificial sweeteners and the microbiome: findings and challenges. *Gut Microbes.* 2015;6:149–55.
6. Standl E, Schnell O, Ceriello A. Postprandial hyperglycemia and glycemic variability. *Diabetes Care.* 2011;34:S120–S127.
7. Fujiwara S, Imada T, Nakagita T, Okada S, Nammoku T, Abe K, et al. Sweeteners interacting with the transmembrane domain of the human sweet-taste receptor induce sweet-taste synergisms in binary mixtures. *Food Chem.* 2012;130:561–8.
8. Service FJ. Glucose variability. *Diabetes.* 2013;62:1398–404.
9. Herrera Moro Chao D, Argmann C, Van Eijk M, Boot RG, Ottenhoff R, Van Roomen C, et al. Impact of obesity on taste receptor expression in extra-oral tissues: emphasis on hypothalamus and brainstem. *Sci Rep.* 2016; 6 <https://doi.org/10.1038/srep29094>.
10. Brown RJ, Walter M, Rother KI. Effects of diet soda on gut hormones in youths with diabetes. *Diabetes Care.* 2012;35:959–64.

RESUME

Les édulcorants ont été progressivement introduits dans l'alimentation humaine dans le but, de réduire l'apport calorique mais aussi de limiter les répercussions sur les niveaux de glycémie, tout en préservant le goût sucré, élément essentiel du plaisir gustatif. Plusieurs travaux de recherche ont néanmoins suggéré, contrairement aux intentions premières, que cette consommation d'édulcorants quotidienne pouvait participer à augmenter le risque de devenir obèse ou diabétique mais aussi le risque de mortalité cardiovasculaire. **Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été d'identifier les effets d'une consommation chronique de boissons contenant des édulcorants de synthèse et non caloriques, seuls ou en synergie, sur le contrôle glycémique et la physiologie vasculaire, afin de comprendre le risque accru d'événements cardiovasculaires observé chez les consommateurs fréquents d'édulcorants.** Ainsi, nous avons pu mettre en évidence chez le rongeur la sensibilité du tissu vasculaire à l'exposition de l'acésulfame de potassium (Ace-K) et du sucralose, sensibilité qui semble indépendante de l'activation des récepteurs du goût sucré. De manière intéressante, les effets vasomoteurs de ces édulcorants sont apparus antagonistes l'un envers l'autre. Les études actuelles suggèrent également l'implication des édulcorants dans la survenue de facteurs de risque cardiovasculaire tel que l'obésité. Toutefois dans notre modèle, la consommation de sucralose dans le cadre d'un régime gras a permis au contraire de limiter les altérations de ce régime sur l'accumulation de tissu adipeux et sur le contrôle de la glycémie, mais également de potentialiser la réponse vasodilatatrice artérielle chez les souris. Ainsi, nos résultats démontrent l'importance d'identifier les conséquences propres directes (sur les cellules du tissu vasculaire) et indirectes (modulation des facteurs de risque cardiovasculaires) de chaque molécule sur la physiologie vasculaire. Néanmoins, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer les effets spécifiques de chaque molécule sur cette balance vasomotrice.

Mots clés : édulcorants artificiels ; risque cardiovasculaire ; fonction vasculaire; obésité ; contrôle glycémique ; insuline

ABSTRACT

Artificial sweeteners have been extensively introduced into human diets with the objective of decreasing caloric intake and normalize the levels of blood glucose, while preserving an essential element of taste pleasure, the sweet taste. Nevertheless, several studies have suggested that a daily and sustained consumption of sweeteners could contribute to the increased risk of becoming obese or diabetic but also to the increased cardiovascular mortality risk. **In this context, the objective of this work was to identify the effects of chronic consumption of beverages containing synthetic and non-caloric sweeteners on glycemic control and vascular physiology.** Thus, we were able to demonstrate in rodents the sensitivity of vascular tissue to acesulfame potassium (Ace-K) and sucralose exposure that appears to be independent of sweet taste receptor activation. Interestingly, the vasomotor effects of these artificial sweeteners appeared to be antagonistic to each other. Current studies also suggest the involvement of artificial sweeteners in the occurrence of cardiometabolic disease such as obesity. Surprisingly, in our model, the consumption of sucralose appears to limit the deleterious effects of a high fat diet on body composition and glycemic control. The sucralose consumption even potentiated the vasodilatory arterial response in our mice model. Thus, according to the effects observed on glucose homeostasis, our results demonstrate the importance of identifying the specific direct (on vascular tissue cells) and indirect (modulation of cardiovascular risk factors) consequences of each molecule on vascular physiology. Nevertheless, further studies are needed to evaluate the specific effects of each molecule on this vasomotor balance.

Keywords: artificial sweeteners; cardiovascular risk; vascular function; obesity; glycemic control; insulin